



# THESE

Obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par *Université de Toulouse III Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité *Biologie Cellulaire et Physiopathologie*

---

Présentée et soutenue par Aurélie Millet

Le 17 juillet 2014

**Titre :** Implication de la protéine mitochondriale OPA1 dans l'homéostasie redox et caractérisation de ses partenaires protéiques : quelles conséquences sur la pathogenèse de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 ?

---

## JURY

<b>Mme Marisol Corral-Debrinsky</b> , Directeur de Recherche, Institut de la Vision, Paris	Rapporteur
<b>Mr Daniel Brethes</b> , Directeur de Recherche, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire, Bordeaux	Rapporteur
<b>Mr Jean-Michel Peyrin</b> , Chargé de Recherche, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur
<b>Mr Louis Casteilla</b> , Professeur, STROMALab, Toulouse	Examineur
<b>Mme Noélie Davezac</b> , Enseignant-Chercheur, Centre de Biologie du Développement, Toulouse	Directrice de thèse
<b>Mme Pascale Belenguer</b> , Professeur, Centre de Biologie du Développement, Toulouse	Directrice de thèse

---



# SOMMAIRE

---

RESUME .....	7
ABSTRACT.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION.....	16
<b>I. LES MITOCHONDRIES, FONCTIONS ET DYSFONCTIONS .....</b>	<b>16</b>
<i>I. 1. Origine et historique.....</i>	<i>16</i>
<i>I. 2. Structure et composition.....</i>	<i>17</i>
I. 2. 1. Structure .....	18
I. 2. 2. L'ADN mitochondrial.....	18
I. 2. 3. L'import des protéines mitochondriales .....	19
<i>I. 3. Les fonctions des mitochondries .....</i>	<i>22</i>
I. 3. 1. Rôle énergétique de la mitochondrie .....	23
I. 3. 1. 1. Le cycle de Krebs .....	24
I. 3. 1. 2. La phosphorylation oxydative .....	24
I. 3. 2. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose.....	33
I. 3. 3. Les autres fonctions mitochondriales .....	35
<i>I. 4. Biogenèse mitochondriale .....</i>	<i>36</i>
<i>I. 5. La dynamique mitochondriale.....</i>	<i>40</i>
I. 5. 1. La fission mitochondriale : les acteurs et la mécanistique.....	42
I. 5. 2. La fusion mitochondriale : les acteurs et la mécanistique .....	45
I. 5. 3. La fusion des membranes externes et internes : un phénomène couplé ?.....	47
I. 5. 4. Les (dys)fonctions de la dynamique mitochondriale et modèles animaux .....	47
I. 5. 4. 1. Les fonctions de la dynamique mitochondriale, un bref aperçu .....	47
I. 5. 4. 2. Les dysfonctions de la dynamique mitochondriale et modèles animaux .....	48
<i>I. 6. Dysfonctions mitochondriales et implication dans des pathologies .....</i>	<i>50</i>
I. 6. 1. Maladies mitochondriales .....	50
I. 6. 2. Mitochondries et rétinopathies .....	53
I. 6. 3. Les mitochondries : cibles thérapeutiques .....	54
<b>II. (DYS)FONCTIONS D'OPA1 ET ATROPHIE OPTIQUE DOMINANTE DE TYPE I (ADOA-1).....</b>	<b>57</b>
<i>II. 1. OPA1 : protéine mitochondriale responsable de l'ADOA-1 .....</i>	<i>57</i>
II. 1. 1. OPA1 et régulations post-traductionnelles .....	57
II. 1. 1. 1. OPA1 : forme courte ou forme longue, quelles fonctions ?.....	57
II. 1. 1. 2. OPA1 et acétylation.....	61
II. 1. 2. Les fonctions d'OPA1 .....	61
II. 1. 2. 1. OPA1, l'acteur de la fusion des membranes internes mitochondriales.....	61
II. 1. 2. 2. OPA1, jonction des crêtes et apoptose .....	62
II. 1. 2. 3. OPA1 dans le maintien de l'ADN mitochondrial .....	63
II. 1. 2. 4. OPA1 et métabolisme énergétique mitochondrial.....	64
<i>II. 2. ADOA-1, une rétinopathie génétique rare.....</i>	<i>65</i>
II. 2. 1. Tableaux cliniques de la pathologie .....	65

II. 2. 2. Profils génétiques des mutations d'OPA1.....	67
II. 3. Implication de la protéine OPA1 dans d'autres pathologies.....	69
II. 3. 1. OPA1 et LHON.....	69
II. 3. 2. Le glaucome .....	69
II. 3. 3. OPA1 et cancer.....	70
II. 4. Les modèles <i>in vitro</i> et animaux de l'ADOA-1 .....	71
II. 4. 1. Les modèles <i>in vitro</i> : les cellules de patients atteints d'ADOA-1 .....	71
II. 4. 2. Les modèles invertébrés .....	71
II. 4. 3. Les modèles vertébrés .....	73
II. 4. 3. 1. Le poisson zèbre.....	73
II. 4. 3. 2. La souris B6;C3-Opa1 <sup>329-355del</sup> .....	73
II. 4. 3. 3. La souris B6;C3-Opa1 <sup>Q285STOP</sup> .....	74
II. 4. 3. 4. La souris Opa1 <sup>delTTAG</sup> .....	75
<b>III. L'ETAT REDOX : UN EQUILIBRE ENTRE ESPECES ACTIVES DE L'OXYGENE ET DEFENSES ANTIOXYDANTES .....</b>	<b>76</b>
III. 1. Les Espèces Actives de l'Oxygène .....	76
III. 1. 1. Réactions d'oxydo-réduction et état redox.....	76
III. 1. 2. Définition et nature des Espèces Actives de l'Oxygène .....	76
III. 2. Origines des EAO dans la cellule .....	78
III. 2. 1. La mitochondrie .....	79
III. 2. 1. 1. Site de production des EAO .....	79
III. 2. 1. 2. Modulation de la production des EAO mitochondriales .....	79
III. 2. 2. Les sources non mitochondriales .....	81
III. 3. Les défenses antioxydantes : systèmes de gestion directe des EAO .....	81
III. 3. 1. Les enzymes .....	82
III. 3. 2. Les molécules « piègeurs » .....	85
III. 4. La voie de signalisation du facteur de transcription NRF2 .....	86
III. 5. Les effets délétères des EAO.....	89
III. 5. 1. Le stress oxydant .....	90
III. 5. 2. EAO et maladies neurodégénératives.....	90
III. 5. 3. La théorie radicalaire du vieillissement.....	91
III. 5. 3. 1. Le vieillissement.....	91
III. 5. 3. 2. Le vieillissement cellulaire ou sénescence.....	92
III. 5. 3. 3. Sénescence, EAO et mitochondries.....	92
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>95</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>98</b>
<b>I. EFFETS DE LA DIMINUTION D'OPA1 SUR L'HOMEOSTASIE REDOX ET CONSEQUENCES SUR LA PATHOGENESE DE L'ADOA-1 .....</b>	<b>98</b>
I. 1. Contexte et objectifs.....	98
I. 2. Modèles expérimentaux et méthodologie .....	99
I. 2. 1. Les cellules HeLa .....	100
I. 2. 2. Les neurones en culture primaire.....	100
I. 2. 3. Les fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1 .....	101



I. 2. 4. Les souris <i>OPA1</i> <sup>+/-</sup> .....	101
<b>I. 3. Résultats .....</b>	<b>101</b>
I. 3. 1. Caractérisation du métabolisme oxydatif dans des cellules déplétées pour OPA1, par une stratégie d'interférence à l'ARN .....	101
I. 3. 2. Impact de la perte d'OPA1 sur l'état redox .....	107
I. 3. 3. Effets de la perte d'OPA1 sur la voie de signalisation de NRF2 .....	107
I. 3. 4. Effets d'un stress oxydant sur la viabilité des neurones déplétés pour OPA1 .....	113
I. 3. 5. Détermination du statut redox chez les souris <i>OPA1</i> <sup>+/-</sup> modèles de l'ADOA-1 .....	116
I. 3. 6. Caractérisation du statut antioxydant de fibroblastes issus de peau de patients atteints d'ADOA-1 .....	118
<b>I. 4. Conclusion .....</b>	<b>121</b>
<b>II. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES D'OPA1 PAR PROTEOMIQUE .....</b>	<b>124</b>
II. 1. Contexte et objectifs .....	124
II. 2. Modèle expérimental et méthodologie .....	126
II. 2. 1. Le modèle choisi .....	126
II. 2. 2. Les techniques utilisées et les mises au point .....	128
II. 3. Résultats .....	130
II. 3. 1. Les données de la protéomique .....	130
II. 3. 2. La validation des candidats obtenus .....	135
II. 4. Conclusion .....	137
<b>III. INFLUENCE D'OPA1 SUR LA MORPHOLOGIE DES MITOCHONDRIES ET SUR LA MATURATION NEURONALE .....</b>	<b>139</b>
III. 1. Contexte et objectifs .....	139
III. 2. Modèle expérimental et méthodologie .....	139
III. 3. Résultats .....	140
III. 3. 1. Caractérisation de la morphologie des mitochondries au cours de la maturation neuronale .....	140
III. 3. 2. Caractérisation de l'activité des mitochondries au cours de la maturation neuronale .....	140
III. 3. 3. Effets de la perte de fonction d'OPA1 sur la morphologie et le fonctionnement des mitochondries dans les neurones .....	141
III. 3. 4. Effets de la perte de fonction d'OPA1 sur la maturation neuronale .....	141
III. 4. Conclusion .....	141
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>160</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>179</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>214</b>
<b>ARTICLE .....</b>	<b>223</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>281</b>

# Résumés

---

# RESUME

---

L'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) est une rétinopathie héréditaire qui se traduit par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine suivie d'une atrophie du nerf optique. L'ADOA-1 est caractérisée par une diminution de l'acuité visuelle, pouvant entraîner la cécité et reste à l'heure actuelle sans recours thérapeutique. Une forme syndromique nommée « ADOA-1 plus » touche environ 20% des patients et se traduit par des atteintes extra-oculaires de type ataxie ou surdité. Des mutations du gène codant la protéine mitochondriale OPA1 ont été décrites comme responsables de l'ADOA-1 et aboutissent dans la majorité des cas à un phénomène d'haploinsuffisance. De nombreuses études ont montré que la dynamine OPA1 est impliquée dans la fusion des membranes internes mitochondriales et possède un rôle anti-apoptotique. Des travaux menés sur des modèles cellulaires ou invertébrés de l'ADOA-1 suggèrent une implication de la dynamine dans le métabolisme oxydatif mitochondrial mais ces données restent toutefois controversées et les mécanismes moléculaires sous-jacents inconnus. C'est pourquoi nous avons analysé l'homéostasie redox de la cellule en étudiant l'état du métabolisme oxydatif et la mise en place des défenses antioxydantes. Parallèlement, nous avons identifié l'environnement protéique d'OPA1, par une approche de protéomique, afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués notamment dans les fonctions identifiées de la dynamine.

Des cellules humaines (HeLa) et des neurones corticaux (rat) en culture primaire ont été traités par une stratégie d'interférence ARN pour diminuer l'expression d'OPA1 et ainsi mimer un phénomène d'haploinsuffisance. Dans ces deux modèles, la quantité et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale sont diminuées ainsi que l'activité de l'aconitase, (une enzyme sensible aux taux d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) intra-mitochondriaux) suggérant que le métabolisme oxydatif des cellules est perturbé. La réponse antioxydante a été mesurée par l'analyse d'une des voies principales de détoxification faisant intervenir le facteur de transcription NRF2, qui est activé dans les deux modèles invalidés pour OPA1. De plus, certaines enzymes cibles de NRF2, comme les superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD1/2), la catalase et GSTP1, voient leur quantité et/ou leur activité augmentées. Ainsi, la perte d'OPA1 induit une dérégulation de l'homéostasie redox : les cellules sont dans un état pro-oxydant. Lors de l'application d'un stress oxydatif exogène aigu, les neurones traités par un siOPA1 ne voient pas leurs défenses antioxydantes augmentées et meurent plus que les cellules contrôles, suggérant une saturation des activités antioxydantes. Ensuite, nous avons montré une diminution drastique de l'activité de l'aconitase de cortex de souris modèles de l'ADOA-1, à 4 et 10 mois, caractéristique d'une production élevée d'EAOs mitochondriaux. Ainsi, comme les modèles

cellulaires, les souris mutées pour OPA1 sont dans un état pro-oxydant. Nous avons de plus analysé l'expression des enzymes antioxydantes dans des fibroblastes de peau de patients atteints d'ADOA-1. Certains individus présentent des niveaux protéiques d'enzymes de détoxification très faibles, notamment les SOD1 et 2. Ces patients seraient donc plus sensibles aux stress exogènes tels que les UVs ou l'hypoxie, ce qui constituerait un facteur aggravant de la pathologie.

Enfin, les résultats de l'interactome de la dynamine ont permis l'identification de 3 protéines partenaires (dans 3 réplicats biologiques), dont une enzyme du métabolisme oxydatif, appuyant l'implication d'OPA1 dans la régulation de l'état redox.

Ces résultats ouvrent donc de nouvelles pistes pour la compréhension de la pathogenèse de l'ADOA-1 et permettraient de proposer des perspectives thérapeutiques à court terme, comme l'utilisation de molécules antioxydantes, pour prévenir ou retarder l'atrophie optique et/ou les syndromes extra-oculaires des patients.

---

# ABSTRACT

---

Dominant Optic Atrophy (DOA) is a common cause of inherited visual failure affecting at least 1 in 50 000 persons in Europe. OPA1 mutations are the main genetic cause of DOA, causing bilateral symmetrical optic atrophy due to specific loss of retinal ganglion cells. Although optic nerve degeneration remains the hallmark of DOA, a syndromic form called “DOA plus”, including deafness, ataxia and/or myopathy, was recently reported to affect up to 20% of all mutations carriers. More than 200 mutations have been listed, most are truncations in line with haploinsufficiency being the major pathogenic mechanism of DOA. OPA1 is a dynamin anchored to the inner mitochondrial membrane and involved in mitochondrial dynamics, and also has an anti-apoptotic function. Some reports using cellular or invertebrate models of DOA suggest a role of OPA1 in oxidative metabolism, but they still remain controversial and the precise mechanistic involved in DOA pathogenesis is still unknown. To characterize the molecular and cellular consequences of OPA1 loss of function (depletion or mutations), we have studied intracellular redox homeostasis through oxidative metabolism and antioxidant defenses. In addition, we have looked for OPA1-partners to unravel the dynamin functions.

To mimic haploinsufficiency in human cells (HeLa) and in rodent cortical neurons in primary culture, OPA1 was down-regulated by an RNA interference strategy. In both models, the amount and activity of the mitochondrial respiratory chain proteins is decreased, as well as the activity of aconitase, which is sensitive to intra-mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS), indicating that the cellular oxidative metabolism is disturbed. To evaluate the cellular antioxidant responses, we focused on the major detoxification pathway centered on the NRF2 transcription factor, which we found active in both OPA1 down-regulated cellular models. Furthermore, some NRF2 target proteins quantity and/or activity are increased, such as superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, 2), catalase and GSTP1. Thus, down-regulation of OPA1 induced a deregulation of redox homeostasis: cells are in a pro-oxidative state. Moreover, upon application of an acute exogenous oxidative stress, OPA1-depleted neurons do not show any increase of their antioxidant defenses and die earlier than control cells. We hypothesize that these OPA1-depleted cells become sensitive to oxidative stress, which could induce cell death since the antioxidant machinery can not be further activated. To extend our analysis to a more physiological model, we measured the redox state status of cortices of OPA1<sup>+/-</sup> mice. We found a high ROS level in cortices of 4 and 10 month-old animals, evaluated indirectly by aconitase activity drastic decrease. Thus, like the cellular models, OPA1<sup>+/-</sup> mice appear to be in a disturbed redox state.

Since the redox homeostasis deregulations observed in cellular and animal models could explain DOA pathogenesis, we determined if these disturbances were found in patients' cells. We evaluated antioxidant enzymes quantities in skin fibroblasts of DOA patients and found cases of very low defenses, for instance of superoxide dismutase, a key ROS detoxifying enzyme. Thus, these patients may be more sensitive to exogenous stress such as UV or hypoxia, which can be aggravating factors of the disease and could lead to accelerated RGC loss.

Finally, to shed more light on OPA1 functions, we conducted an interactome analysis to identify its protein partners, in rodent primary cortical neurons. Among the 3 proteins identified in 3 independent replicates, we found an oxidative metabolism enzyme, in line with our previous results on the involvement of OPA1 in redox state regulation.

Therefore, our results open novel ways for the understanding of DOA pathogenesis and could provide therapeutic perspectives, such as the use of antioxidant molecules to prevent or slowdown optic atrophy and extra-ocular symptoms.

# Liste des Abréviations

---

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

**8-OHdG** : 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine  
**Acétyl CoA** : acétyl-coenzyme A  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ADNmt** : acide désoxyribonucléique mitochondrial  
**ADP** : adénosine 5'-diphosphate  
**ADOA-1** : atrophie optique autosomale dominante de type 1  
**AFG3L1 et AFG3L2** : ATPase family gene 3-like  
**AIF** : apoptosis inducing factor  
**ANT** : translocase des nucléotides adénilyques / adenine nucleotide translocase  
**ARE** : antioxidant responsive element  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : acide désoxyribonucléique messenger  
**ATP** : adénosine 5'-triphosphate  
**Bak** : Bcl-2 homologous antagonist-killer  
**Bax** : Bcl-2-associated X protein  
**Bcl-2** : B-cell leukemia protein-2  
**Bcl-xl** : B-cell lymphoma-extra large  
**CC** : coiled-coil  
**CCCP** : carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone  
**CGR** : cellules ganglionnaires de la rétine  
**CMT2A** : Charcot Marie Tooth de type 2A  
**COX** : cytochrome c oxydase  
**CS** : citrate synthase  
**C-terminal** : carboxy-terminal  
**Cyt c** : Cytochrome c  
**DMEM** : Dulbecco's modified Eagles medium  
**Dnm1** : dynamine 1  
**DNP** : dinitrophénol  
**Do** : densité optique  
**DRP1** : dynamin-related protein 1  
**EAO** : espèces actives de l'oxygène  
**eat-3** : eating abnormal 3  
**EDTA** : acide éthylène diaminetétracétique  
**EGTA** : acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétracétique  
**EIM** : espace intermembranaire  
**endoG** : endonucléase G  
**ERG** : électrorétinogramme  
**FAD, FADH<sub>2</sub>** : flavine adénine dinucléotide, formes oxydée et réduite  
**FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone  
**Fe-S** : Fer-Soufre  
**Fis1** : fission 1  
**FMN, FMNH<sub>2</sub>** : flavine mononucléotide formes oxydée et réduite  
**FZO1** : fuzzy onion 1  
**GED** : GTPase effector domain  
**GFAP** : Glial fibrillary acidic protein  
**GFP** : green fluorescent protein  
**GPx** : glutathion peroxydase



**GSSG, GSH** : glutathion, formes oxydée et réduite  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**H<sub>2</sub>O** : eau  
**H<sub>2</sub>-DCFDA** : 2',7' –dichlorofluorescéine diacétate  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène  
**HIF** : hypoxia inducible factor  
**HK** : hexokinase  
**HPLC** : High-performance liquid chromatography  
**HR** : heptad repeat  
**HSP60** : Heat shock protein de 60 kdaltons  
**i-AAA** : intermembrane space-facing AAA protease  
**IAP** : inhibitors of apoptosis proteins  
**J12** : jour 12 après mise en culture  
**JC-1** : 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide  
**kb** : kilo base  
**Keap1** : kelch ECH associating protein 1  
**KIF1B** : kinesin family member 1B  
**KO** : knock-out  
**KSS** : kearns-sayre syndrome  
**LC3** : microtubule-associated protein light chain 3  
**LRRK2** : leucine rich repeat kinase 2  
**LHON** : neuropathie optique héréditaire de Leber  
**MA** : maladie d'Alzheimer  
**m-AAA** : matrix-facing AAA protease  
**MAF** : mouse adult fibroblast  
**MAP2** : microtubule-associated protein 2  
**MAPK** : mitogen activated protein kinase  
**MARCH** : membrane-associated RING-CH protein  
**mCU** : mitochondrial calcium uniporter  
**Mdivi-1** : mitochondrial division inhibitor 1  
**MDM33** : mitochondrial distribution and morphology  
**ME** : membrane externe  
**MEF** : mouse embryonic fibroblast  
**MELAS** : mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes  
**MERRF** : myoclonic epilepsy with ragged red fibres  
**MFF** : mitochondrial fission factor  
**MFN1, 2** : mitofusine 1 et 2  
**MH** : maladie de Huntington  
**Mgm1** : mitochondrial genome maintenance  
**MI** : membrane interne  
**MIS/MTS** : mitochondrial import sequence ou mitochondrial targeting signal  
**mitoPLD** : mitochondrial phospholipase D  
**MP** : maladie de Parkinson  
**MPTP** : 1-methyl-4-phenyl1,2,3,6-tetrahydropyridine  
**Msp1** : mgm1 de Schizosaccharomyces pombe  
**NAD<sup>+</sup>, NADH, H<sup>+</sup>** : nicotinamide adénine dinucléotide, formes oxydée et réduite  
**NADP, NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, formes oxydée et réduite  
**NARP** : neurogenic ataxia with retinitis pigmentosa  
**NLS** : nuclear localization sequence  
**NO** : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique  
**NOX** : NADP(H) oxydases  
**NRF-1/NRF-2** : nuclear respiratory factor 1 ou 2

**NRF2/NFE2L2** : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ou nuclear factor E2-related factor 2  
**N-terminal** : amino-terminal  
**O<sub>2</sub>** : oxygène  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : anion superoxyde  
**OMA1** : Outer Membrane Auxiliary  
**OPA1, 3** : optic atrophy 1 et 3  
**OXPHOS** : phosphorylation oxydative  
**PARL** : presenilin associated rhomboïd like protease  
**PEG** : polyéthylène glycol  
**PHB2** : Prohibitin-2  
**Pi** : phosphate inorganique  
**PI3** : phosphoinositide 3  
**PINK1** : PTEN putative kinase 1  
**PKA** : protéine kinase A  
**PKC** : protéine kinase C  
**PTP** : pore de transition de perméabilité  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**ROOH** : hydroperoxydes  
**RRF** : ragged red fibres  
**SAM** : sorting and assembly machinery  
**SDH** : succinate déshydrogénase  
**SDS** : sodium-dodecyl-sulfate  
**SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
**siARN** : small interfering ARN  
**SH** : groupements sulfhydryles  
**SIMH** : stress-induced mitochondrial hyperfusion  
**SLP-2** : stomatin-like protein 2  
**Smac/Diablo** : second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein of low PI  
**SNC** : système nerveux central  
**S-S** : ponts disulfures  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**TEMED** : tetramethylethylenediamine  
**TIM** : translocase de la membrane Interne  
**TM** : transmembranaire  
**TOM** : translocase de la membrane externe  
**Tris** : tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
**TRP** : tetratricopeptide  
**TTX** : tétrodotoxine  
**UCP** : uncoupling protein  
**Ugo1** : ugo is Japanese for fusion  
**UV** : ultraviolet  
**VDAC** : voltage-dependent anion channel  
**WT** : sauvage  
**YME1L** : « yeast mitochondrial escape 1-like »  
**ΔΨ** : potentiel de membrane

# Introduction

# INTRODUCTION

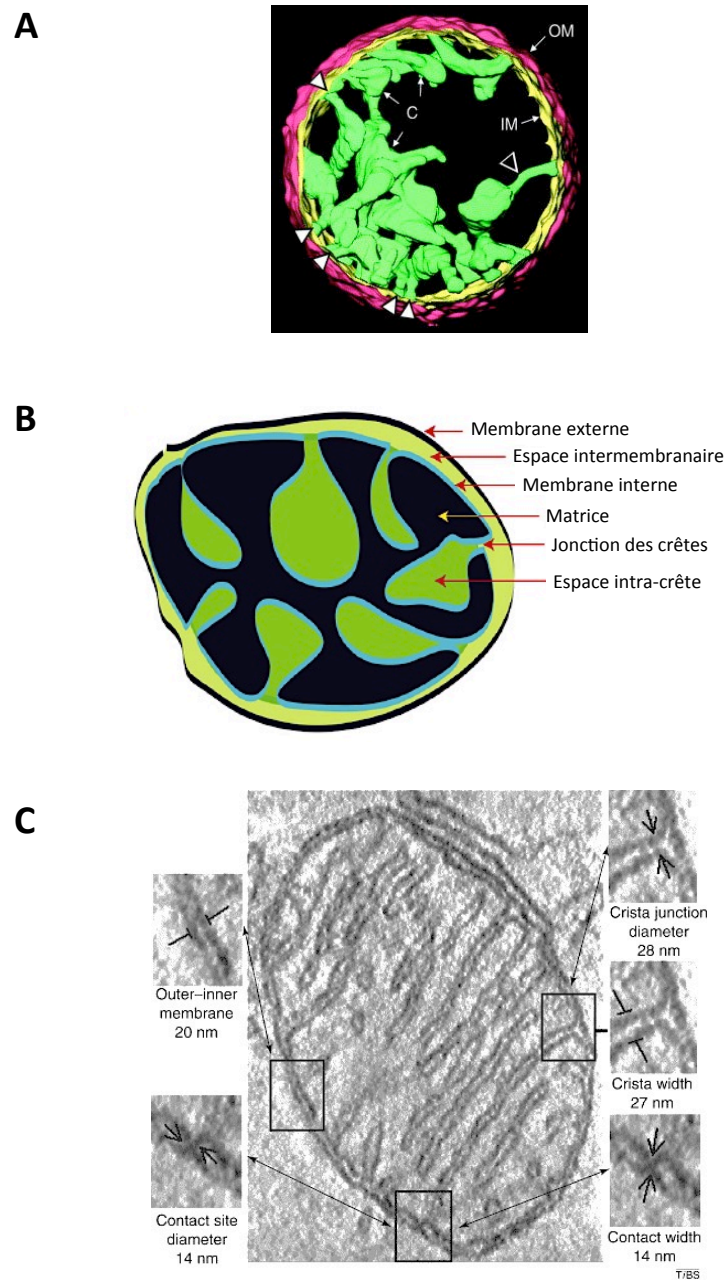
---

## I. Les mitochondries, fonctions et dysfonctions

### I. 1. Origine et historique

L'origine des mitochondries pourrait être expliquée par la théorie endosymbiotique proposée par Lynn Margulis en 1966. En effet, les mitochondries seraient le résultat de l'endosymbiose entre deux bactéries, archéobactérie anaérobie (hôte) d'une part et protobactérie aérobie (symbionte) d'autre part, responsable de la formation d'un eucaryote primitif. Les eucaryotes évolués auraient pris naissance par la suite d'associations symbiotiques avec différents procaryotes. Cette hypothèse endosymbiotique a été suggérée grâce à la découverte d'analogies génétiques et biochimiques entre les bactéries et les mitochondries, notamment par l'étude du génome mitochondrial, en 1980, et la caractérisation de la composition lipidique des membranes, riches en cardiolipides (Lang et al. 1999).

Le médecin suisse Kölliker fut le premier à visualiser et décrire les mitochondries dans des cellules musculaires, en 1858. Elles furent par la suite appelées « mitochondries » du grec *mitos* (filament) et *chondros* (grain), en référence à leur morphologie. En 1890, une technique de coloration fut mise au point par le cytologiste Altmann démontrant ainsi la présence de mitochondries dans quasiment toutes les cellules, exceptés les érythrocytes. Ce n'est qu'en 1940 que la purification de mitochondries fut réalisée pour la première fois. Le biochimiste Claude mit au point un fractionnement cellulaire à partir d'hépatocytes, par une technique de centrifugation différentielle. Hogeboom et Schneider ont par la suite amélioré cette technique en utilisant une solution de saccharose isotonique ayant la propriété de préserver l'intégrité et la morphologie des mitochondries. Dès lors, la structure des mitochondries a pu être observée au microscope électronique permettant de les décrire comme des organites délimités par deux membranes, mesurant entre 0.5 et 1  $\mu\text{M}$  de diamètre et pouvant atteindre 10  $\mu\text{M}$  de long (Frey and Mannella 2000).



**Figure 1 – La mitochondrie et ses compartiments**

**(A, B)** Représentation schématique des différents compartiments d'une mitochondrie, réalisée à partir d'un cliché de tomographie électronique. **(C)** Images en microscopie électronique d'une mitochondrie.

OM : membrane externe, IM : membrane interne, C : crête mitochondriale.

Source : (B) Yamaguchi R et al., 2009, (A et C) Frey et Mannella, 2000.

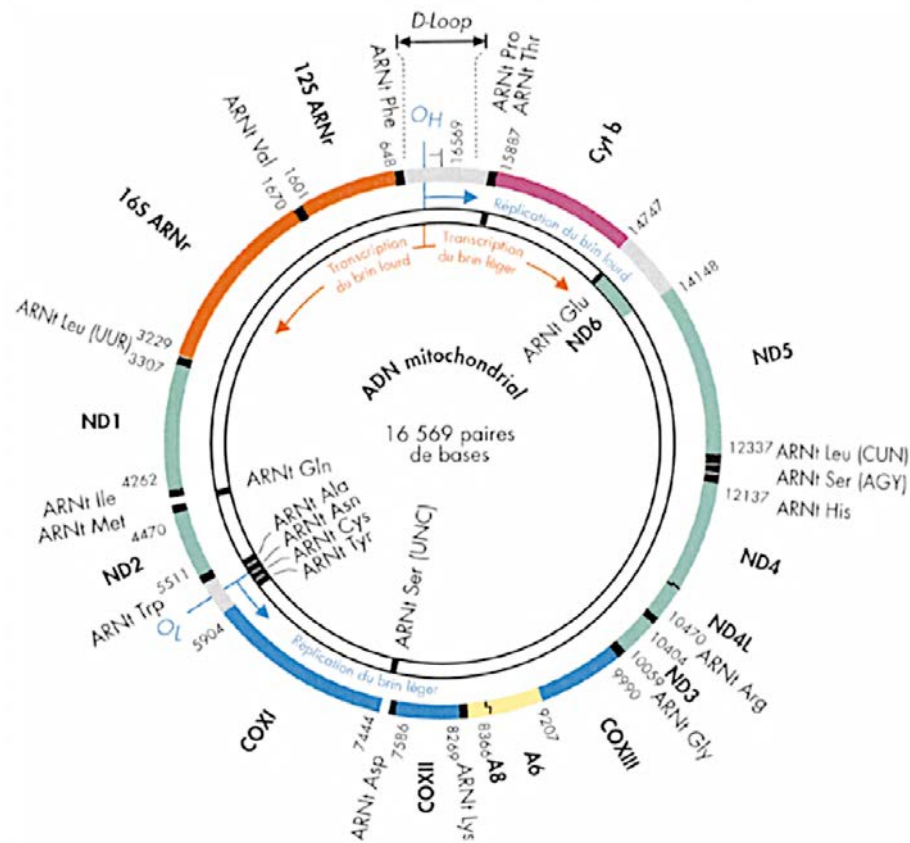
## I. 2. Structure et composition

### I. 2. 1. Structure

Les premières analyses en microscopie électronique, obtenues dans les années 1950, ont permis d'établir le modèle de Palade qui décrit les mitochondries comme des organites possédant une membrane externe, qui sépare l'organite du cytosol, et une membrane interne délimitant l'espace inter-membranaire et la matrice (Palade 1953) (Figure 1). La membrane interne forme des replis dans la matrice, appelés crêtes mitochondriales. La tomographie électronique a permis d'affiner ce modèle en montrant que les crêtes mitochondriales se rattachent à la membrane interne par des structures tubulaires étroites appelées jonctions de crêtes d'un diamètre de 10 à 50 nM (Mannella 2006). Ces jonctions délimitent ainsi un cinquième compartiment, l'espace intra-crête, avec des compositions lipidiques et protéiques différentes de la membrane interne sous-jacente à la membrane externe, comme un enrichissement en cardiolipides et la présence des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chu et al. 2013; Kagan et al. 2006).

### I. 2. 2. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est localisé dans la matrice au sein d'une structure nucléoprotéique appelé le nucléoïde. L'ADNmt est associé à ABF2, une protéine fonctionnellement homologue aux histones, à des facteurs impliqués dans la transcription, la réplication et la réparation (Cheng and Ivessa 2010; Garrido et al. 2003; Muftuoglu et al. 2014). L'association des nucléoïdes à la membrane interne semble essentielle à l'intégrité de l'ADNmt (Boesch et al. 2010; Stuart et al. 2005). L'ADNmt est circulaire, double-brin et 'multicopie' (une centaine de copies/cellule chez l'homme). Il a subi au cours de l'évolution des modifications conduisant à une perte et/ou au transfert d'une grande partie de l'information vers le noyau (Gabaldón and Huynen 2004). L'ADNmt humain, de 17kb, encode environ 1 % des protéines mitochondriales totales, 13 protéines, ainsi que 2 ARN ribosomiques et 22 ARN de transfert (Figure 2). Les 13 protéines sont des composants des cinq complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale : ND1 à 6 et ND4 (complexe I), le cytochrome b (complexe III), les cytochromes oxydases 1 à 3 (complexe IV) et les sous-unités ATP6 et 8 (complexe V). Les autres protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire et possèdent un signal d'adressage à la mitochondrie pour être prises en charge par le système d'import de l'organite (Schmidt et al. 2010).



### Figure 2 – L'ADN mitochondrial humain

Le génome mitochondrial encode 2 ARN ribosomiques (orange), 22 ARN de transfert et contient 13 gènes codants pour des sous-unités de la chaîne respiratoire (complexe I en vert, complexe III en violet, complexe IV en bleu et complexe V en jaune).

Source : site de John Libbey Eurotext (<http://www.jle.com>).

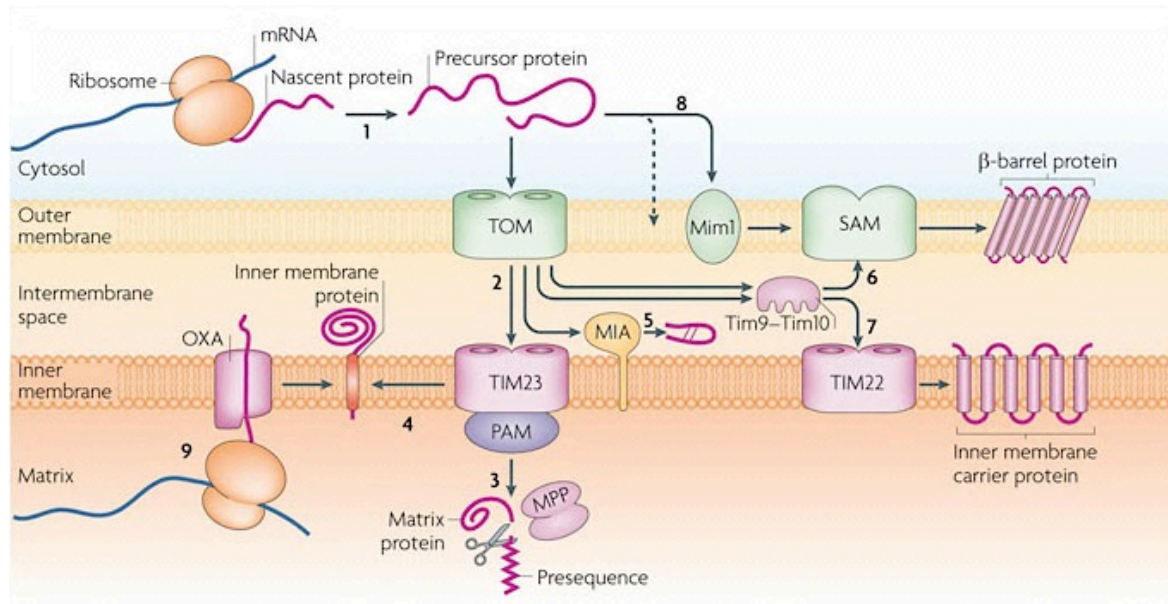
### I. 2. 3. L'import des protéines mitochondriales

Seulement 1% des protéines mitochondriales sont codées par le génome mitochondrial. Ainsi, la majeure partie des protéines est synthétisée sous la forme de précurseur dans le cytosol pour être prise en charge par des chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique (HSP70, Heat Shock Protein 70). Ces interactions permettent alors le maintien du précurseur protéique dans une conformation compatible avec son import dans la mitochondrie. La nature des précurseurs protéiques diffère selon leur destination finale (membrane externe (ME), espace intermembranaire (EIM), membrane interne (MI) et matrice). Ils contiennent une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS : Mitochondrial Targeting Sequence) localisée pour les deux tiers des protéines en N-terminal et suivie d'un site de clivage (protéine matricielles et quelques protéines de la membrane interne). Ce signal peut également être intégré au milieu du polypeptide et conservé dans la protéine mature (protéines membranaires) (Bolender et al. 2008).

La membrane externe constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, la perméabilité étant assurée en grande partie par la présence d'une protéine formant un canal transmembranaire : VDAC (voltage-dependent anion channel). Cette protéine permet le passage des molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Les molécules supérieures à 10 kDa sont prises en charge par les complexes d'importation TOM/TIM (Translocase of the Outer Membrane/Translocase of the Inner Membrane) localisés au niveau d'une zone d'accolement entre les membranes externe et interne (Dudek et al. 2013) (Figure 3). Les protéines possédant un signal d'adressage à la mitochondrie (MTS) sont reconnues par le complexe TOM et franchissent ainsi la membrane externe. Ce complexe se compose de sous-unités permettant l'ancrage de précurseurs protéiques (TOM20, TOM22 et TOM70) et de sous-unités formant le canal nécessaire à la translocation (TOM5, TOM6, TOM7 et TOM40) (Neupert 1997; Neupert and Herrmann 2007). Les protéines de la membrane externe ayant un domaine transmembranaire y sont insérées directement. Les protéines en feuillet  $\beta$  comme VDAC ou TOM40 sont ensuite prises en charge par le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) localisé à la membrane externe. Les protéines de l'espace intermembranaire (IMS) sont libérées puis prises en charge par des chaperonnes qui assurent leur repliement (Bohnert et al. 2012; Chacinska et al. 2009).

La membrane interne a une composition qui diffère des autres membranes biologiques avec environ 80 % de protéines pour seulement 20 % de phospholipides. Ainsi, elle est beaucoup moins perméable que la membrane externe et constitue une barrière sélective entre la matrice et l'espace intermembranaire. Le passage des protéines adressées à la membrane interne par le complexe TIM





**Figure 3 – Les différentes voies d’import des protéines mitochondriales**

La plupart des protéines mitochondriales sont synthétisées par les ribosomes cytosoliques et importées jusqu’au complexe TOM (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane) (1). Après leur passage par le canal TOM (2), les protéines peuvent emprunter différentes machineries (3-7). Celles qui présentent une pré-séquence destinée à la matrice sont prises en charge par le complexe TIM23 (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) et PAM (Presequence translocase-Associated Motor) puis la pré-séquence est alors clivée par les MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) (3). Les protéines intégrées dans la membrane interne sont insérées dans la bicouche lipidique à partir du complexe TIM23 (4). Les protéines solubles dans l’espace intermembranaire sont prises en charge par TIM23 puis MIA (Mitochondrial Intermembrane space Assembly) (5). TIM9 et TIM10 sont des complexes qui permettent le transport des protéines hydrophobes vers le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) pour les protéines à feuillet  $\beta$  destinées à la membrane externe (6) ou par le complexe TIM22 pour les protéines de la membrane interne (7). Certaines protéines qui contiennent des hélices  $\alpha$  peuvent être intégrées à la membrane externe par d’autres voies que le complexe TOM, comme Mim1 (Mitochondrial Import 1) (8). Enfin, les protéines synthétisées à partir des ribosomes mitochondriaux sont adressées à la membrane interne *via* la machinerie OXA (Oxidative Assembly) (9).

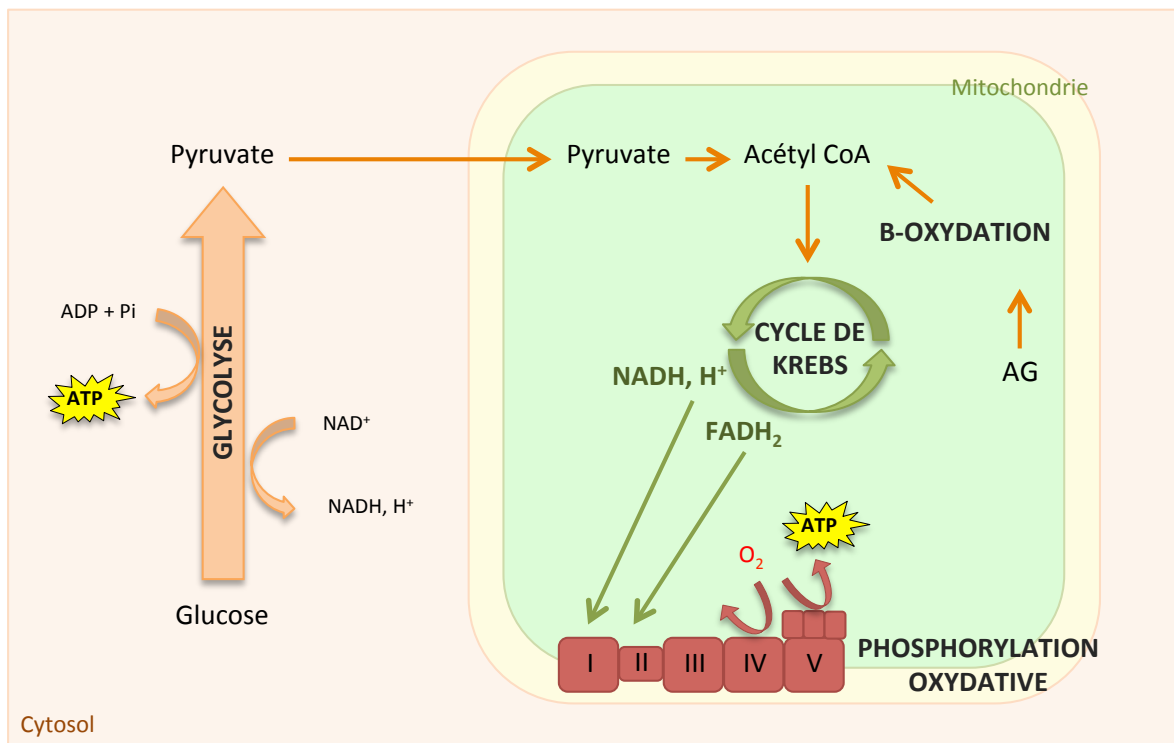
Source : Schmidt O. et al., 2010.

nécessite un potentiel de membrane mitochondrial (de -150 à -180mV) et de l'énergie sous forme d'ATP (Dudek et al. 2013) (Figure 3). Ce complexe est composé de TIM50 qui reconnaît les séquences de signal d'import des protéines de l'IMS, de TIM23 qui forme le canal et de TIM21 qui couple la machinerie d'import à la chaîne respiratoire (Van der Laan et al. 2006). Ces trois sous-unités interagissent avec le complexe TOM pour faciliter le passage des protéines de la ME vers la MI. La présence d'un domaine hydrophobe dans la séquence d'une protéine constitue un signal d'arrêt de transfert : la séquence est clivée et la protéine diffuse latéralement dans la MI. Pour les protéines intégrales de la MI, le précurseur est pris en charge par TIM9-10 qui le transfère vers TIM22 pour l'insérer dans la MI (Chacinska et al. 2009). Les protéines adressées à la matrice transitent par le complexe PAM (Presequence Associated translocase Motor) constitué de l'ATPase Hsp70 mitochondriale (Hsp70mt) et de TIM44 qui reconnaît le peptide signal d'import.

Certaines molécules ne nécessitent pas l'import par le complexe TOM/TIM mais sont prises en charge par des transporteurs tels que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) qui réalise l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur du phosphate inorganique, le transporteur du pyruvate, la navette glycérol 3-phosphate et la navette malate/aspartate. Ces substrats, une fois disponibles au niveau de la matrice mitochondriale, sont utilisés pour les voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

### I. 3. Les fonctions des mitochondries

La mitochondrie occupe une place centrale dans la balance vie (survie) ou mort des cellules. Elle est au cœur du métabolisme énergétique car elle produit l'essentiel de l'ATP intracellulaire grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Figure 4). De plus, elle représente un carrefour métabolique entre la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la synthèse des acides aminés. Elle participe également à des processus cellulaires clefs comme l'homéostasie calcique, la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAO), l'apoptose, la synthèse de l'hème et le cycle de l'urée. Des atteintes du fonctionnement mitochondrial, par des mutations de l'ADNmt ou des perturbations de l'activité énergétique de l'organite, peuvent être responsables de nombreuses pathologies, principalement neurodégénératives.



**Figure 4 – Glycolyse et métabolisme oxydatif mitochondrial**

Une molécule de glucose est dégradée par la glycolyse, dans le cytosol, où une succession de réactions enzymatiques aboutit à la production de pyruvate, d'ATP et de NADH, H<sup>+</sup>. Le pyruvate est transporté jusque dans la matrice mitochondriale par des transporteurs transmembranaires. Il est ensuite catabolisé en acétyl CoA par la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl CoA est également produit suite à la  $\beta$ -oxydation des acides gras (AG). L'acétyl-CoA est ensuite pris en charge par le cycle de Krebs et sa dégradation aboutit à la production d'équivalents réduits, le NADH, H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub>. Ces deux molécules sont oxydées par les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative permet la respiration cellulaire, au niveau du complexe IV, et la production d'ATP par l'ATP synthase (ou complexe V).

*Les rapports stoechiométriques ne sont pas conservés dans ce schéma.*

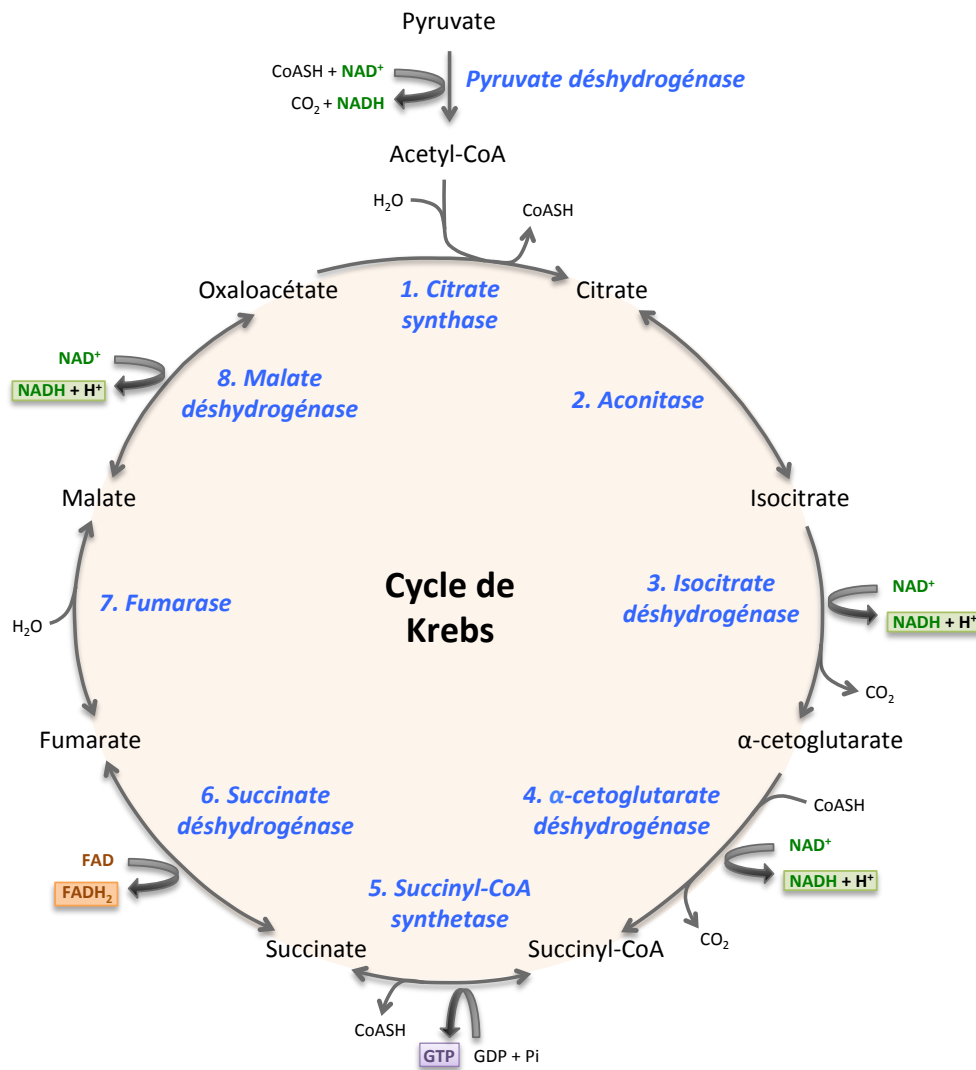
### I. 3. 1. Rôle énergétique de la mitochondrie

#### *I. 3. 1. 1. Le cycle de Krebs*

Le cycle de Krebs (CK), ou cycle de l'acide citrique, est un processus central dans le métabolisme du glucose, des lipides et des acides aminés (Krebs 1937, Nunes-Nesi et al. 2013). La glycolyse aboutit à la formation de pyruvate, qui est ensuite acheminé dans la mitochondrie par une translocase, puis décarboxylé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Les acides gras transitent par le biais de transporteurs (carnitine palmitoyl-transférase) jusqu'à la matrice mitochondriale et sont ensuite dégradés en acétyl-CoA et acyl-CoA lors de la  $\beta$ -oxydation (Figure 4). L'acétyl-CoA est ensuite oxydé par une succession de réactions enzymatiques du CK (Figure 5). L'ensemble de ces réactions aboutit à la production de deux molécules de  $\text{CO}_2$ , une molécule de GTP, et de dérivés réduits essentiels au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale : 3 molécules de NADH,  $\text{H}^+$  (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et une molécule de  $\text{FADH}_2$  (Flavin Adenine Dinucleotide).

#### *I. 3. 1. 2. La phosphorylation oxydative*

Les réactions qui se déroulent au niveau du cycle de Krebs permettent de fournir les intermédiaires énergétiques à la chaîne respiratoire et à l'ATP synthase qui, par une série de phosphorylations oxydatives, vont assurer la respiration cellulaire et la production d'ATP. L'ensemble des complexes mitochondriaux (de I à V) est composé de plus de quatre-vingt protéines différentes, treize d'entre elles étant codées par l'ADNmt et les autres par le génome nucléaire. La chaîne respiratoire (complexe I à IV) et les transporteurs mobiles (coenzyme Q et cytochrome c) assurent une série d'oxydo-réductions qui transfèrent les électrons du NADH,  $\text{H}^+$  (complexe I) et du  $\text{FADH}_2$  (complexe II) jusqu'au complexe IV où l'accepteur final d'électrons, l'oxygène moléculaire, est réduit en eau (Chaban et al. 2014) (Figure 6). Chaque complexe dans la chaîne a une plus grande affinité pour les électrons que son prédécesseur, et les électrons passent donc d'un complexe à l'autre jusqu'à être finalement transférés à l'oxygène, qui a l'affinité la plus grande pour les électrons. Parallèlement aux oxydoréductions, un transfert de protons de la matrice mitochondriale à l'IMS s'établit au niveau des complexes I, III et IV, ce qui génère une différence de potentiel de -150 à -180mV entre la membrane interne mitochondriale et le cytosol : le potentiel de membrane mitochondrial. Le gradient de protons crée une énergie électrochimique, la force proton motrice, qui est utilisée par le complexe V, ou  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP synthase, pour la phosphorylation d'ADP en ATP (Mitchell 1966, Koopman et al. 2013).



**Figure 5 – Le cycle de Krebs**

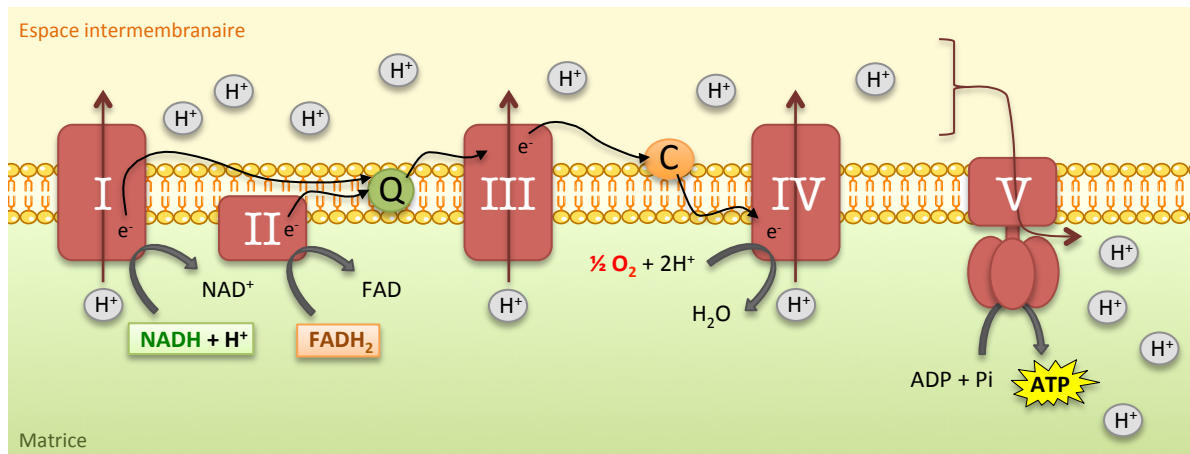
Le cycle de Krebs, qui a lieu dans la matrice mitochondriale, permet de dégrader l'acetyl-CoA par une succession de réactions enzymatiques. Les enzymes sont notées en bleu, numérotées de 1 à 8, et les substrats/produits sont en noir. Chaque cycle aboutit à la formation de 3 molécules de NADH,  $\text{H}^+$  (en vert), d'une molécule de  $\text{FADH}_2$  (en orange), de 2 molécules de  $\text{CO}_2$  et enfin une molécule de GTP (en violet). Les équivalents réduits produits, le NADH,  $\text{H}^+$  et le  $\text{FADH}_2$ , constituent les substrats respectifs des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale.

- **Le complexe I : NADH ubiquinone oxidoreductase**

Le complexe I est le plus gros des cinq complexes respiratoires chez les mammifères avec 45 sous-unités dont sept codées par le génome mitochondrial (ND1-ND6 et ND4L). Ce complexe est le principal point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Sa forme réduite FMNH<sub>2</sub> (flavine mononucléotide) permet le transfert des électrons du NADH, H<sup>+</sup> aux centres Fe-S qui cèdent ensuite leur électron par ré-oxydation au Coenzyme Q (ubiquinone). Cette réaction s'accompagne d'un transfert de quatre protons de l'intérieur de la matrice vers l'IMS. Chez les mammifères, le complexe I a une forme de « L », composé de deux bras perpendiculaires : un bras hydrophobe enchâssé dans la membrane interne mitochondriale contenant les sous-unités codées par l'AD nMt, qui constituent le site catalytique de l'enzyme, et un bras périphérique hydrophile dépassant dans la matrice. Cette structure engendre trois modules fonctionnels : le module déshydrogénase responsable de l'oxydation du NADH, H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup>, le module hydrogénase, responsable du transfert d'électrons à l'ubiquinone et le module de translocation des protons constituant la majeure partie du bras membranaire (Fernández-Vizarra et al. 2009). La réduction de l'ubiquinone, due au transfert des électrons, induit un changement de conformation du complexe I, ce qui permet le transport des protons de la matrice à l'espace intermembranaire (Baradaran et al. 2013; Sazanov et al. 2013). Le complexe I est aussi un site majeur de production d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) : les électrons qui s'échappent interagissent directement avec et le dioxygène.

- **Le complexe II : Succinate coenzyme Q réductase ou succinate déshydrogénase**

Le complexe II est constitué de quatre sous-unités (A à D) chez les mammifères, toutes codées par le génome nucléaire. Il est constitué d'un domaine hydrophobe (sous-unités C et D) enchâssé dans la membrane interne mitochondriale et d'un domaine hydrophile (sous-unités A et B) dépassant dans la matrice. Il constitue le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. En effet, il permet le transfert des électrons du succinate à l'ubiquinone, par l'intermédiaire d'un centre Fe-S, connectant ainsi directement le cycle de Krebs à la chaîne respiratoire. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à la translocation de protons. La part du complexe II dans la production d'anion superoxyde est négligeable en comparaison des complexes I et III. Toutefois, une augmentation de la quantité de succinate et du potentiel de membrane dans des mitochondries isolées induit un flux reverse d'électrons du complexe II au I, ce qui entraîne un accroissement de la production d'anion superoxyde (Selivanov et al. 2011; Votyakova and Reynolds 2001). De plus, le groupe flavine de la sous-unité SDHA du complexe II conduit également à la production d'anion superoxyde (Guzy et al. 2008; Yankovskaya et al. 2003).



### Figure 6 – La phosphorylation oxydative (OXPHOS)

La chaîne respiratoire est composée de 4 complexes protéiques notés de I à IV. La phosphorylation oxydative est le couplage entre la respiration (complexe I à IV) et la production d'ATP au niveau du complexe V. Le cycle de Krebs fournit des équivalents réduits donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire, le NADH, H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub>, respectivement au complexe I et II. Les électrons transitent le long de la chaîne respiratoire par l'intermédiaire des transporteurs mobiles, le coenzyme Q (ubiquinone, Q) et le cytochrome c (C), pour permettre la respiration au niveau du complexe IV : l'oxygène est réduit en eau. Le gradient de protons, généré par les complexes I, III et IV au niveau de l'espace intermembranaire, permet la production d'ATP par l'ATP synthase (complexe V).

*Les rapports stoechiométriques ne sont pas conservés dans ce schéma.*

- **Le complexe III : Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase ou complexe cytochrome bc<sub>1</sub>**

Le complexe III est présent sous forme de dimère dans la membrane interne mitochondriale. Chez les mammifères, chaque monomère est composé de onze sous-unités structurales différentes, dont une est codée par l'ADNmt (cytochrome *b*) (Guzy et al. 2005). Trois sous-unités contiennent les centres Fe-S responsables du transfert d'électrons : le cytochrome *b*, le cytochrome *c*<sub>1</sub> et la protéine Rieske Fe-S. La fonction des autres sous-unités reste à élucider. Le complexe III participe au transfert de deux électrons de l'ubiquinone réduite (ou ubiquinol) au cytochrome *c*, transporteur d'électrons mobile associé à la face externe de la membrane interne mitochondriale. Ce transfert est couplé à la translocation de 2 protons vers l'espace intermembranaire. Ce complexe est également un site de production de l'anion superoxyde.

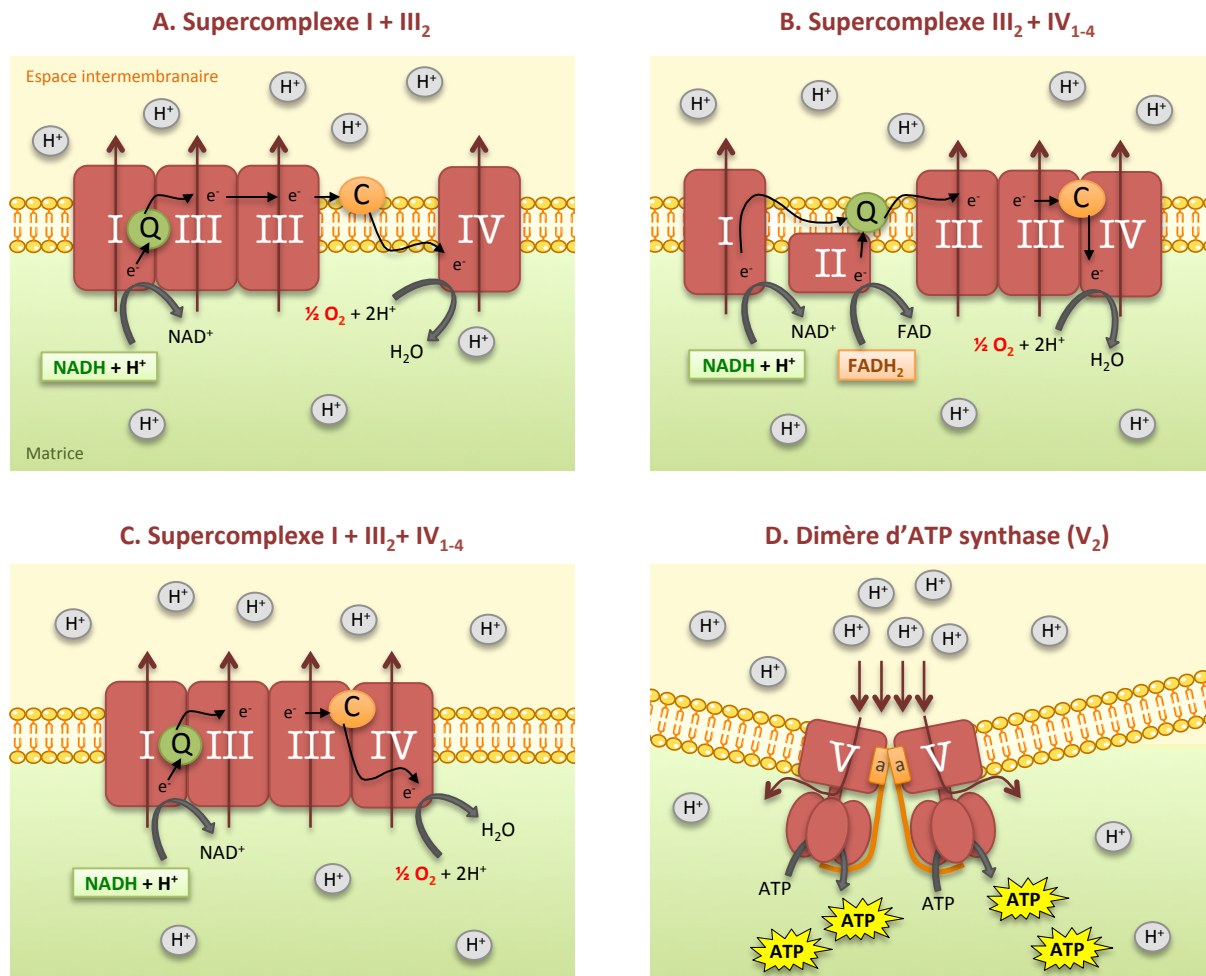
- **Le complexe IV : Cytochrome c oxydase**

Chez les mammifères, le complexe IV, ou COX, est composé de treize sous-unités et représente le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Les trois sous-unités protéiques les plus grosses sont codées par l'ADNmt. Deux de ces sous-unités (COX I et COX II), constituent le centre catalytique de l'enzyme impliqué dans le transfert d'électrons et la troisième jouerait un rôle dans le pompage des protons. Les dix sous-unités restantes sont codées par l'ADN nucléaire ; leur fonction est actuellement mal connue mais elles pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'activité catalytique ainsi que dans l'assemblage et la stabilisation du complexe (Fernández-Vizarra et al. 2009; Stiburek et al. 2006). Le complexe IV permet d'oxyder le cytochrome *c* réduit : le cytochrome *c* va se déplacer sur la membrane interne pour transporter les électrons aux centres fer/cuivre du complexe. La molécule d'oxygène, l'accepteur final d'électrons, est alors réduite en 2 molécules d'eau. Le complexe IV contribue également au gradient de protons en transloquant des protons à travers la membrane interne mitochondriale.

- **Le complexe V : ATP synthase**

L'ATP synthase est une enzyme fonctionnellement réversible : i) elle synthétise de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) en utilisant la force protomotrice à travers la membrane interne ou bien ii) en absence de gradient transmembranaire de protons, elle hydrolyse l'ATP en pompant les protons hors de la matrice. L'organisation de l'ATP synthase est conservée de la levure aux mammifères et est constituée de deux moteurs, F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> (Habersetzer et al. 2013). Le domaine catalytique hydrophile F<sub>1</sub>, localisé dans la matrice, est composé de 5 sous-unités communes à toutes les cellules eucaryotes : 3 copies des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et une copie de  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$ . Le domaine hydrophobe membranaire F<sub>0</sub> est ancré dans la membrane interne mitochondriale et permet la





**Figure 7 – Les supercomplexes de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Cette figure schématise les quatre principaux types d'organisation des complexes de la chaîne respiratoire en supercomplexes, identifiés dans de nombreuses espèces. En (A), le supercomplexe est une association entre le complexe I et un dimère du complexe III. Les électrons transitent par l'intermédiaire du coenzyme Q puis sont transportés par le cytochrome c jusqu'aux complexes IV libres ou associés (en C), pour permettre la respiration cellulaire. En (B), on trouve un dimère du complexe III associé au complexe IV (il peut y en avoir jusqu'à 4). Dans chaque cas de figure, le cytochrome c peut être intégré aux supercomplexes ou sous forme libre. Enfin, en (D), l'ATP synthase peut être associée en dimère (puis en oligomère), ce qui permet un meilleur rendement énergétique. De plus, cette association induit une courbure de la membrane interne et a donc un impact sur la structuration des crêtes mitochondriales.

*Pour revue Chaban et al., 2013.*

translocation des protons. Chez les mammifères, il est constitué des sous-unités *a*, *A6L*, *c<sub>8</sub>*, *b*, *d*, *F<sub>6</sub>*, *f*, *OSCP* (*Oligomycin Sensitivity-Confering Protein*) *e* et *g* (Jonckheere et al. 2012). Les sous-unités *c* sont organisées en anneaux constitués de 8 copies, comme il a été montré dans des mitochondries de bœuf (Watt et al. 2010). Les autres sous-unités sont présentes en une seule copie. Les deux sous-unités *a* et *A6L* du domaine F<sub>0</sub> sont codées par l'ADN mitochondrial, respectivement par les gènes *ATP6* et *ATP8* (Anderson et al. 1981). L'ATP synthase peut être divisée en deux parties distinctes : une partie mobile nommé « rotor » (sous-unités *c*,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) et une partie fixe, le « stator » (sous-unités  $\alpha_3\beta_3$ , *a*, *b*, *d*, *F<sub>6</sub>* et *OSCP*) (Devenish et al. 2008; Grover et al. 2008). Le passage des protons à l'interface entre rotor et stator dans le domaine membranaire F<sub>0</sub> cause la rotation de la tige ( $\gamma$ ) qui déforme les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du domaine extra-membranaire F<sub>1</sub> et fournit à celles-ci l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.

- **Organisation en supercomplexes**

On a longtemps pensé que les complexes de la chaîne respiratoire diffusaient librement dans la membrane interne mitochondriale, mais l'existence de supercomplexes a été mise en évidence par de nombreuses études comme des analyses électrophorétiques de type Blue Native PAGE (BN-PAGE) (Arnold et al. 1998; Leary 2012; Schägger and Pfeiffer 2000). De nombreux types de supercomplexes ont été décrits dans différents organismes eucaryotes, de la plante à l'homme (Chaban et al. 2014).

#### Les différents supercomplexes

Quatre différents supercomplexes ont alors été décrits dans de nombreuses espèces (Cruciat et al. 2000; Dudkina et al. 2008; Schägger and Pfeiffer 2000; Vonck and Schäfer 2009) (Figure 7). Les complexes I, III et IV peuvent s'assembler en 3 supercomplexes. **Les supercomplexes I + III<sub>2</sub>** sont les plus abondants dans les plantes où 90-100 % du complexe IV est sous forme monomérique. Ils résultent d'une association latérale entre un dimère du complexe III et la partie membranaire du complexe I. Ils sont les premiers à avoir été caractérisés sur le plan structural chez la plante *Arabidopsis Thaliana* (Dudkina et al. 2005). Ils ont également été décrits dans le cœur de bœuf (Schägger and Pfeiffer 2001; Winge 2012). **Les supercomplexes III<sub>2</sub> + IV<sub>1-2</sub>** ont principalement été identifiés chez les champignons (Heinemeyer et al. 2007; Schägger and Pfeiffer 2000). En effet, chez la levure *S. Cerevisiae*, qui ne possède pas de complexe I, des supercomplexes ont été identifiés : un complexe III dimérique associé à une ou deux copies du complexe IV (III<sub>2</sub> + IV et/ou III<sub>2</sub> + IV<sub>2</sub>) (Boumans et al. 1998; Bruel et al. 1996). **Les supercomplexes I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1-4</sub>** sont abondamment présents chez les mammifères. Ils sont structurés de la même façon que le I + III<sub>2</sub> avec le complexe IV qui est associé à la partie membranaire du complexe I et III (Schägger and Pfeiffer 2000). Cette association de complexes a notamment été rapportée par des études réalisées chez le bœuf (Schäfer

et al. 2006). Ce dernier supercomplexe est appelé « respirasome » car il permet un transit complet des électrons du complexe I au IV, associés aux quinones et au cytochrome c, pour permettre la réduction de l'oxygène en eau.

Le quatrième groupe représente l'**ATP synthase F1F0 organisée en dimère (V<sub>2</sub>)**, capable de s'associer pour former des oligomères (Chaban et al. 2014; Habersetzer et al. 2013). L'interaction entre les monomères d'ATP synthase se fait au niveau des domaines membranaires F<sub>0</sub> notamment par la sous-unité *a* (Wittig and Schägger 2008). De plus, certaines sous-unités du stator (*e*, *g*, *b* et *A6L*) interviennent dans la stabilisation de l'homocomplexe (Bisetto et al. 2008; Wittig and Schägger 2008). Une autre protéine intervient dans la stabilisation des dimères ou oligomères du complexe V, l'inhibiteur IF<sub>1</sub>. Il se lie à l'ATP synthase par le domaine F<sub>1</sub> chez les mammifères et inhibe la production d'ATP en fonction du pH (Van Heeke et al. 1993; Muster et al. 2010; Pullman and Monroy 1963). L'ATP synthase forme également un supercomplexe avec l'ANT et le transporteur de phosphate (Ardehali et al. 2004; Papa et al. 2006).

Le complexe II ne serait pas associé à des supercomplexes. Bien qu'une étude montre l'implication du complexe II dans un respirasome chez la souris (Acín-Pérez et al. 2008), ces résultats n'ont pas été confortés par d'autres études (Muster et al. 2010). La participation du complexe II au cycle de Krebs pourrait expliquer son absence dans les structures de respirasome.

#### Le rôle fonctionnel des supercomplexes

Des supercomplexes et des complexes OXPHOS libres co-existent dans la membrane interne mitochondriale et les associations de complexes en supercomplexes ou *vice versa* sont considérées comme un procédé dynamique dépendant de l'état physiologique de la cellule.

Bien que de nombreuses pistes restent à explorer, la formation de supercomplexes semble être impliquée dans l'efficacité du transfert d'électrons (Acín-Pérez and Enriquez 2013; Vartak et al. 2013). Par exemple, le flux d'électrons ne nécessite pas l'assemblage des complexes I et III en supercomplexes, néanmoins les activités des complexes dans cette conformation sont augmentées (Bianchi et al. 2004; Genova et al. 2008). Dans ces conditions, l'ubiquinone est interconnectée avec les complexes I et III ce qui permet un transfert d'électrons rapide de l'un à l'autre et une diminution des fuites responsables de la production des radicaux libres oxygénés (Finkel and Holbrook 2000).

L'intérêt physiologique des supercomplexes a également été décrit pour l'assemblage et la stabilité des complexes OXPHOS (Acín-Pérez and Enriquez 2013; Vartak et al. 2013). L'assemblage du complexe I dépend du complexe III (Acín-Pérez et al. 2004) et du complexe IV (Diaz et al. 2006) dans des cellules humaines et murines. L'assemblage du complexe I est en effet perturbé lors de la perte

du complexe III mais est totalement inhibé en absence du complexe IV (Li et al. 2007). De même, le complexe I est nécessaire pour un assemblage complet du complexe III dans des cellules humaines (Moreno-Lastres et al. 2012; Ugalde et al. 2004). A l'inverse, la perte du complexe I n'affecte pas l'assemblage et la stabilité du complexe IV (Acín-Pérez et al. 2004; Li et al. 2007).

L'association des complexes V en dimères et oligomères permet de générer des invaginations de la membrane interne mitochondriale et donnerait naissance aux crêtes (Allen et al. 1995). Ce mécanisme a été bien décrit chez la levure (Paumard et al. 2002). La déplétion des sous-unités *e* ou *g*, ou l'inhibition de la synthèse du domaine F1, aboutit à la désorganisation voire à l'absence de crêtes mitochondriales (Lefebvre-Legendre et al. 2005; Paumard et al. 2002). Ainsi, au delà de sa fonction essentielle dans la production d'ATP, l'organisation en supercomplexe de l'ATP synthase permet de moduler la morphologie des crêtes.

- **Le contrôle de la respiration mitochondriale**

A l'échelle de la cellule, l'activité d'OXPHOS peut être contrôlée par de nombreux mécanismes. Les quantités de protéines formant les complexes peuvent être régulées de manière **transcriptionnelle** par des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale (confer partie Biogenèse mitochondriale).

Des modifications **post-traductionnelles** sont également impliquées dans l'activation ou l'inhibition des complexes respiratoires. Par exemple, des processus de phosphorylation et de déphosphorylation des cinq complexes (Carlucci et al. 2008; Hebert-Chatelain 2013; Helling et al. 2012; Kane and Van Eyk 2009; Koopman et al. 2010; Pagliarini and Dixon 2006; Sergio Papa et al. 2012; Yadava et al. 2008), d'acétylation des complexes I, II et V (Guan and Xiong 2011), de glycosylation des complexes I, II et V (Burnham-Marusich and Berninsone 2012), du clivage des complexes I, II et V par des caspases (Martinvalet et al. 2008; Ricci et al. 2004) et des oxydations des cinq complexes par les EAO ou l'oxyde nitrique (Chinta and Andersen 2011; Choksi et al. 2004; Danielson et al. 2011; Galkin and Moncada 2007; Hurd et al. 2008; Murray et al. 2003; Taylor and Moncada 2010) ont été décrits.

**Le découplage de la phosphorylation oxydative (OXPHOS)** permet de réguler l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. Les protéines découplantes UCPs (uncoupling proteins) permettent le flux de protons de l'espace intermembranaire à la matrice, sans passer par le complexe V : la respiration cellulaire est découplée de la production d'ATP, processus qui engendre de la chaleur (Divakaruni and Brand 2011). L'augmentation du taux d'EAO intracellulaire est notamment responsable de l'activation des UCPs, qui elles-mêmes diminuent la production de

radicaux libres. Ainsi, ces molécules serviraient de rétrocontrôle négatif pour diminuer une production accrue d'EAO (Mailloux and Harper 2012).

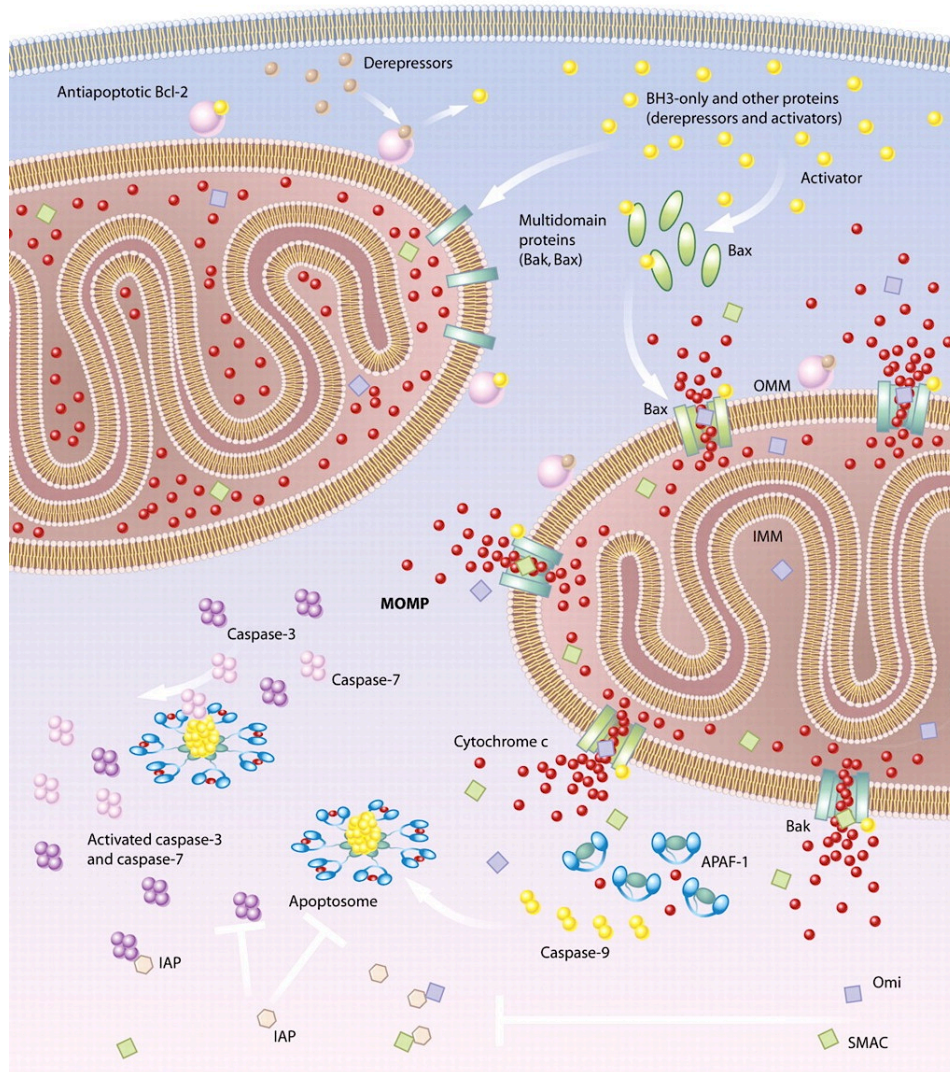
L'activité OXPHOS peut également être régulée en fonction de **la disponibilité des substrats** pour permettre la synthèse de l'ATP. La nature des molécules énergétiques (acides gras, glucose) détermine le ratio NADH,  $H^+$  et  $FADH_2$  produits par le cycle de Krebs. L'oxydation du  $FADH_2$  induit une production d'ATP par la chaîne respiratoire inférieure à 40 %, en comparaison avec le substrat NADH,  $H^+$  (Leverve and Fontaine 2001). De manière indirecte, les systèmes de navette du NADH,  $H^+$  comme la malate/aspartate ou la glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone-phosphate peuvent moduler l'activité OXPHOS en régulant la concentration des équivalents réduits dans la matrice (Leverve and Fontaine 2001).

Enfin, **l'oxyde nitrique** agit également comme un régulateur de la respiration mitochondriale. L'isoforme mitochondriale de l'enzyme NO synthase (mtNOS) est liée aux supercomplexes respiratoires composés des complexes I et IV (Navarro and Boveris 2008). Le NO entraîne une inhibition rapide, sélective, forte mais réversible de la liaison de l'oxygène au complexe IV (Moncada and Bolaños 2006).

### I. 3. 2. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire actif, génétiquement programmé, propre aux eucaryotes supérieurs. Le déclenchement de l'apoptose intervient naturellement au cours du développement embryonnaire ou peut être initiée par la convergence de signaux inducteurs tels que l'altération de l'ADN ou du cycle cellulaire, le stress oxydant et l'hypoxie (Cosentino and García-Sáez 2014; Czabotar et al. 2014). Il existe deux voies distinctes de l'apoptose : la voie extrinsèque, aussi nommée la voie des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie. Cette voie mitochondriale est caractérisée par la perméabilisation de la membrane externe ce qui aboutit à la libération dans le cytosol de molécules originaires de l'espace inter-membranaire et capables d'initier et de réguler l'activation des caspases (Figure 8). Ces protéases, une fois activées, clivent des substrats au niveau de résidus d'acide aspartique (Adams et al. 2004; Wang and Youle 2009).

Deux mécanismes de perméabilisation de la membrane externe sont proposés. Le premier consiste en l'ouverture d'un canal, **le pore de transition de perméabilité (PTP)**, localisé au niveau de sites de contact entre membrane externe et membrane interne mitochondriale. Cette ouverture conduit à une entrée d'eau et de petits solutés au sein de la matrice qui provoque la dilatation de ce compartiment, aboutissant à la rupture de la membrane externe, avec pour effet la libération des



**Figure 8 – L’apoptose par la voie mitochondriale**

Le mécanisme clé de ce processus est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Les facteurs pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, Bax et Bak, sont impliqués dans ce phénomène. En l’absence de signaux apoptotiques, ces molécules sont inhibées par les acteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les protéines BH3-only activent l’apoptose par inhibition des molécules anti-apoptotiques et l’activation des protéines Bax et Bak. La perméabilisation de la membrane par ces agents pro-apoptotiques induit le relargage de différentes molécules comme le cytochrome c (cyt c). Une fois dans le cytosol, le cyt c s’associe avec APAF-1 pour former l’apoptosome, un complexe responsable du recrutement et de l’activation des caspases initiatrices 9, qui à leur tour activent les caspases effectrices 3 et 7. Les protéines IAP inhibent l’activation des caspases effectrices. Ces molécules sont elles-mêmes inhibées par les protéines pro-apoptotiques Smac et Omi, localisées initialement dans l’espace intermembranaire mitochondrial et relarguées dans le cytosol.

Source : Spierings D. et al., 2005.

protéines de l'espace inter-membranaire dans le cytosol. Le deuxième mécanisme implique la formation d'un pore au niveau de la membrane externe par deux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, **Bax et Bak** (Antignani and Youle 2007; Grimm and Brdiczka 2007). Alors que Bak est constitutivement ancrée à la membrane externe mitochondriale (Wei et al. 2000), Bax est principalement présente sous forme monomérique dans le cytosol ou faiblement associée à la membrane externe. Après une étape d'activation, Bax s'insère dans la membrane externe mitochondriale (Billen et al. 2008; Wolter et al. 1997), et ces molécules pro-apoptotiques s'oligomérisent et induisent la formation de pores. La formation de ces pores conduit à la libération de différents facteurs pro-apoptotiques dont le **cytochrome c**, **Smac/Diablo**, **AIF** et **l'endonucléase G (endoG)**. Le cytochrome c libéré s'associe avec du dATP et **Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1)** dans le cytosol pour constituer le cœur d'un complexe multi-proteique, l'apoptosome (Riedl and Salvesen 2007). Ce complexe conduit au recrutement et à l'auto-activation de la caspase 9 qui active à son tour les caspases effectrices 3 et 7. Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein of low PI) interagit dans le cytosol avec des inhibiteurs de caspases, les IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) (Vaux and Silke 2003). Cette interaction a pour effet de titrer l'activité inhibitrice des IAPs et de favoriser ainsi l'activation des caspases (Vaux and Silke 2003). AIF (Apoptosis Inducing Factor), une fois libéré, est transloqué dans le noyau pour participer à la condensation et à la fragmentation de la chromatine (Susin et al. 1996, 1999). Néanmoins, la contribution d'AIF dans la mort cellulaire pourrait dépendre des types cellulaires et des stimuli apoptotiques utilisés. L'endonucléase G est également adressée au noyau où elle induit la fragmentation de l'ADN indépendamment des caspases (Li et al. 2001; Van Loo et al. 2001).

### I. 3. 3. Les autres fonctions mitochondriales

Les mitochondries ont un rôle central, avec le réticulum endoplasmique, dans la régulation de **l'homéostasie calcique**. Ces organites permettent un contrôle fin de la concentration en calcium du cytosol (Kaufman and Malhotra 2014). L'accumulation du calcium dans la matrice mitochondriale est permise grâce au canal uniport MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) et nécessite un potentiel de membrane mitochondrial élevé (Niescier et al. 2013; Thayer and Miller 1990). Le calcium localisé dans la matrice régule les fonctions mitochondriales en participant à la production d'ATP, au contrôle oxydo-réducteur (redox) et à l'apoptose (Brookes et al. 2004). Des élévations de concentration calcique mitochondriale stimulent l'activité des déshydrogénases du cycle de Krebs et celles des complexes IV et V de la chaîne respiratoire (Denton and McCormack 1980; Hansford et al. 1989; Territo et al. 2000).

**La  $\beta$ -oxydation** est une autre voie métabolique importante dans la matrice mitochondriale et aboutit notamment à la production d'acétyl-CoA, de NADH,  $H^+$ , et principalement de  $FADH_2$  (Kerner and Hoppel 2000). Ces métabolites peuvent être utilisés par le cycle de Krebs ou directement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les mitochondries participent, avec le réticulum endoplasmique, à la **biosynthèse des hormones stéroïdiennes** à partir du cholestérol grâce à des cytochromes P450 dans la matrice mitochondriale. La nature du stéroïde dépend de la glande endocrine qui le produit (testostérone dans le testicule, progestérone et œstradiol dans l'ovaire, cortisol ou aldostérone dans la glande surrénale) (Midzak et al. 2011).

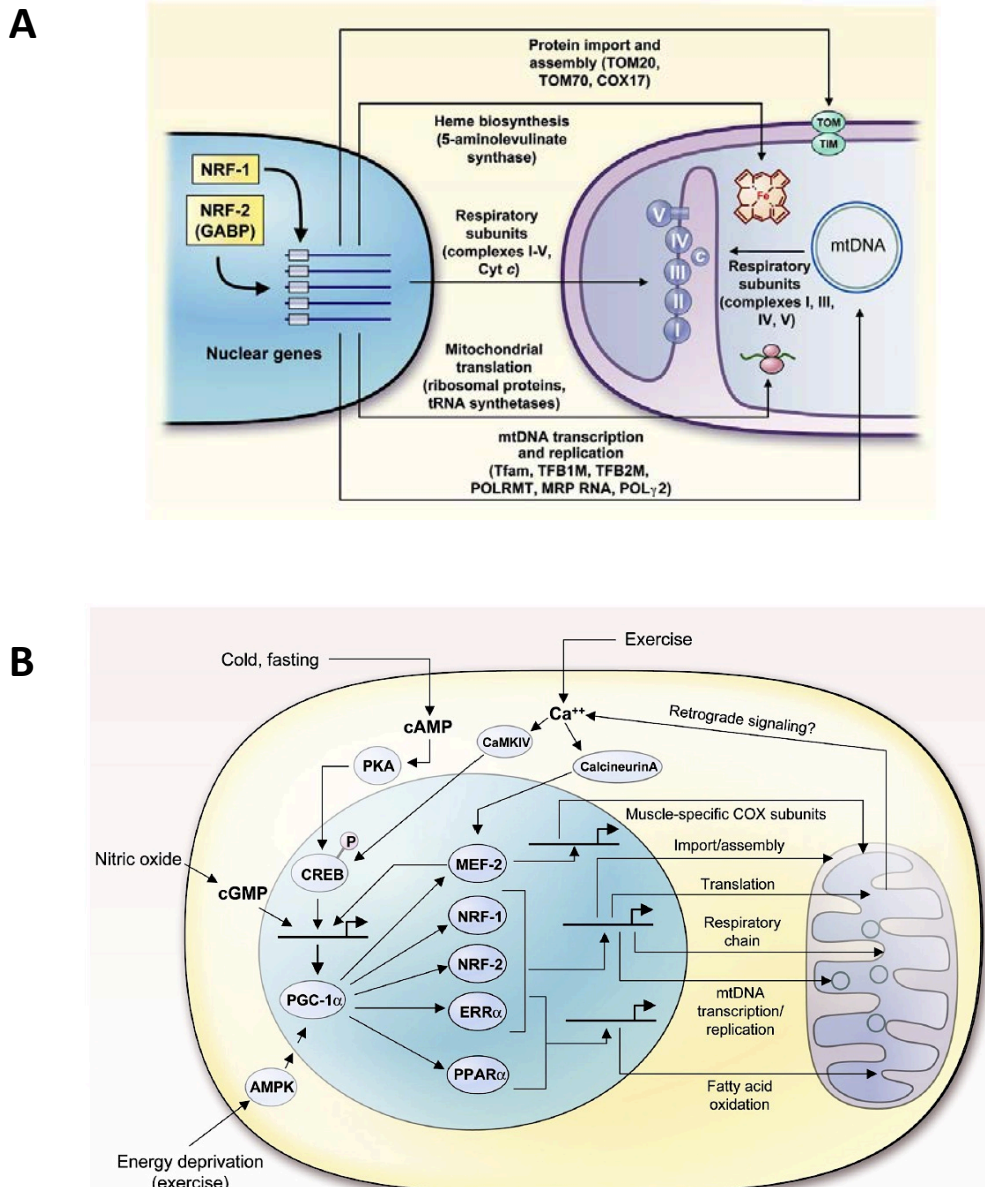
**Le cycle de l'urée** permet de dégrader les acides aminés (dans les hépatocytes) par une succession de quatre réactions enzymatiques. La première réaction a lieu dans la matrice mitochondriale et aboutit à la production de citrulline, molécule qui est ensuite exportée dans le cytosol pour être totalement catabolisée (Enns 2008).

La mitochondrie participe également à la **synthèse de l'hème** (moelle osseuse et foie), élément essentiel au groupe prosthétique présent dans de nombreuses protéines, comme l'hémoglobine et le cytochrome c. Tout comme pour le cycle de l'urée, une partie des réactions enzymatiques a lieu dans le cytosol (Chung et al. 2012).

## I. 4. Biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est un processus clef qui contrôle la masse et donc régule la fonction mitochondriale (Hood 2001; Yao and Brinton 2012). La biogenèse mitochondriale débute par une augmentation de la surface membranaire à l'aide d'un recrutement accru en phospholipides et se poursuit par la synthèse et l'adressage des différentes protéines dans l'ensemble des compartiments sub-mitochondriaux. Etant donnée l'origine mixte des protéines mitochondriales, une coordination étroite entre l'expression du génome mitochondrial et du génome nucléaire est nécessaire pour contrôler finement la biogenèse mitochondriale en fonction des conditions physiologiques. Ainsi, la cellule est capable d'adapter ses capacités énergétiques et ses fonctions mitochondriales en réponse aux stimuli tels que l'activité physique, la restriction calorique, l'exposition au froid, la présence de facteurs hormonaux ou de croissance (Hock and Kralli 2009) puis également au cours du développement en fonction du cycle cellulaire et de l'état de prolifération des cellules (Arakaki et al. 2006).





**Figure 9 – La biogenèse mitochondriale**

(A) Représentation schématique du contrôle de la biogenèse mitochondriale par les facteurs de transcription nucléaires NRF-1 et NRF-2 (GABP). Les NRFs contribuent de manière directe ou indirecte à la transactivation de gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial, et plus récemment dans la machinerie d'import des protéines mitochondriales (TOM/TIM). (B) Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale induite par le co-facteur PGC-1 $\alpha$ . La transcription du gène codant PGC-1 $\alpha$  est induite par le facteur de transcription CREB, lui-même activé en réponse au froid (thermogenèse), au jeûne (néoglucogenèse) ou à l'exercice.

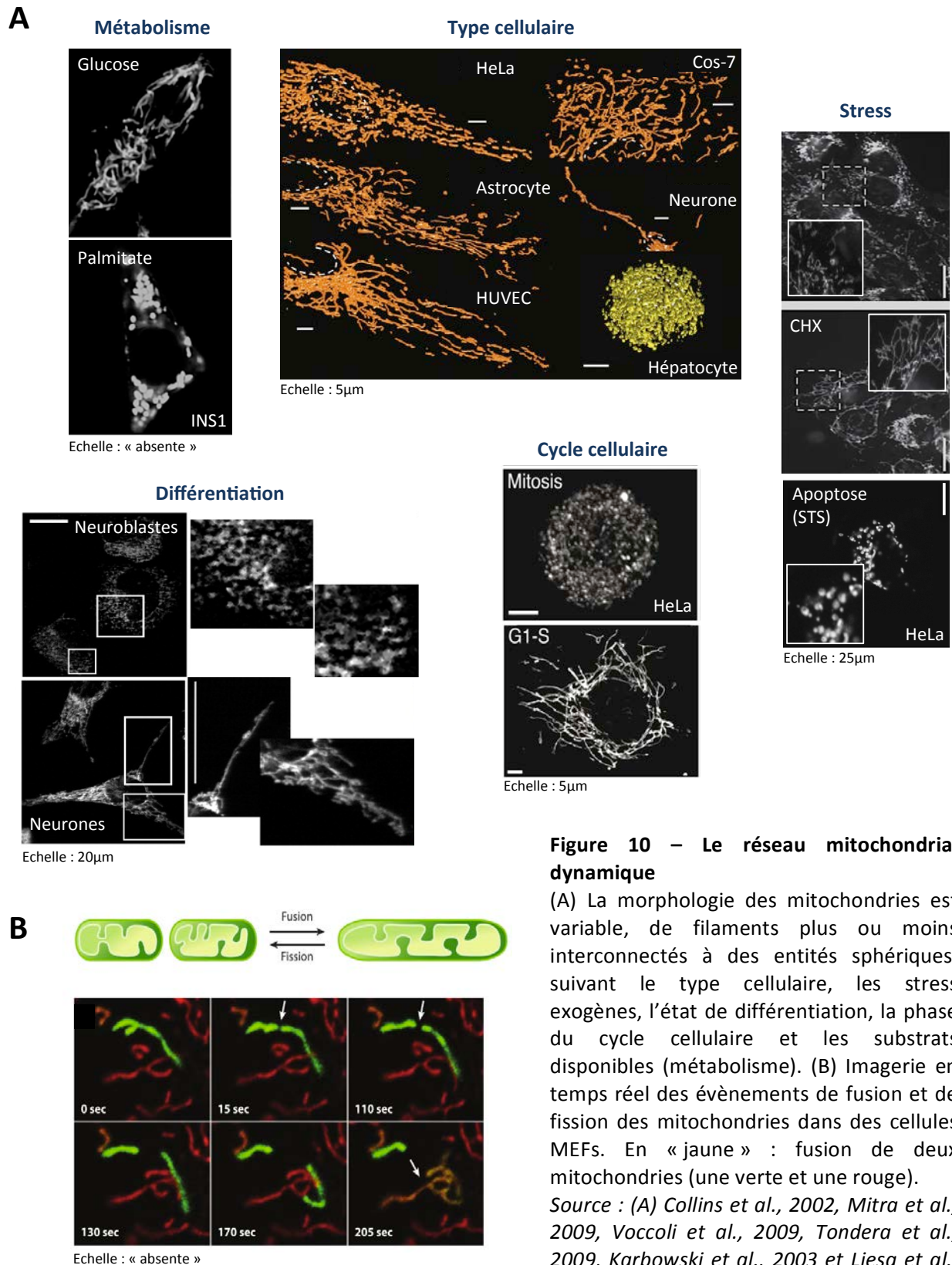
Source : Scarpulla RC., 2008.

Le génome nucléaire contribue à l'expression de plus de 1500 protéines mitochondriales (Calvo et al. 2006; Scarpulla 2008). Leur expression est régulée par les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 (Nuclear Respiratory Factor 1 et 2), ERR $\alpha$  (Estrogen-Related Receptor) et PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), et par une famille de co-activateurs, les PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -coactivator-1), tels que PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  et PRC (PGC-1 related coactivator).

**Les NRFs** (NRF-1 et NRF-2), couplés au co-facteur PGC-1 $\alpha$ , sont des facteurs de transcription qui régulent notamment la coordination entre le génome nucléaire et mitochondrial. Ils permettent entre autre la transactivation de gènes responsables de l'expression de sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale (ATP synthase  $\beta$ , COX II et IV, cytochrome c) (Wu et al. 1999) et de la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (TFAM, TFB1M et TFB2M) (Gleyzer et al. 2005) (Figure 9).

**Les ERRs** (ERR- $\alpha$ , ERR- $\beta$  et ERR- $\gamma$ ) sont des récepteurs nucléaires orphelins constitutivement actifs qui se fixent sur des régions promotrices ERRE (ERR response Element) sous forme de mono-, homo- ou hétéro-dimères. L'œstrogène est également un ligand des récepteurs ERRs, ainsi que TFIIIB qui permet la liaison des ARN polymérases au récepteur. ERR- $\alpha$  est exprimé de façon ubiquitaire, et constitue la forme majoritaire. Il contrôle à la fois les gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Wu et al. 1999) et la phosphorylation oxydative (Mootha et al. 2004) (Figure 9).

**La famille des PGC-1** est très fortement représentée dans des cellules avec une activité oxydative importante, plus particulièrement le co-facteur PGC-1 $\alpha$  exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, le rein, le foie, le pancréas, le cerveau et le tissu adipeux brun (Larrouy et al. 1999). PGC-1 $\alpha$  permet de moduler de nombreuses cascades de signalisation, depuis la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial et nucléaire, jusqu'à l'expression de protéines de la chaîne respiratoire et la réponse au stress oxydant (Figure 9). Ce facteur intervient notamment dans l'adaptation du métabolisme mitochondrial en fonction de diverses situations physiologiques (naissance, exposition au froid et exercice physique). La thermogenèse adaptative en réponse au froid entraîne, dans le tissu adipeux brun, une augmentation du nombre de mitochondries, l'augmentation de la respiration mitochondriale et l'induction du découplage de la respiration. Dans le muscle, consécutivement à un exercice, et dans le cœur, après la naissance, l'augmentation de la biogenèse mitochondriale et de la respiration mitochondriale s'accompagnent d'une synthèse accrue d'ATP. Les niveaux d'ARNm de PGC-1 $\alpha$  sont augmentés dans ces deux situations suggérant un rôle central de cette protéine dans la régulation des fonctions mitochondriales (Lehman et al. 2000; Puigserver et al. 1998; Russell et al. 2003). PGC-1 $\alpha$  apparaît comme un gène clé dans la mise en place



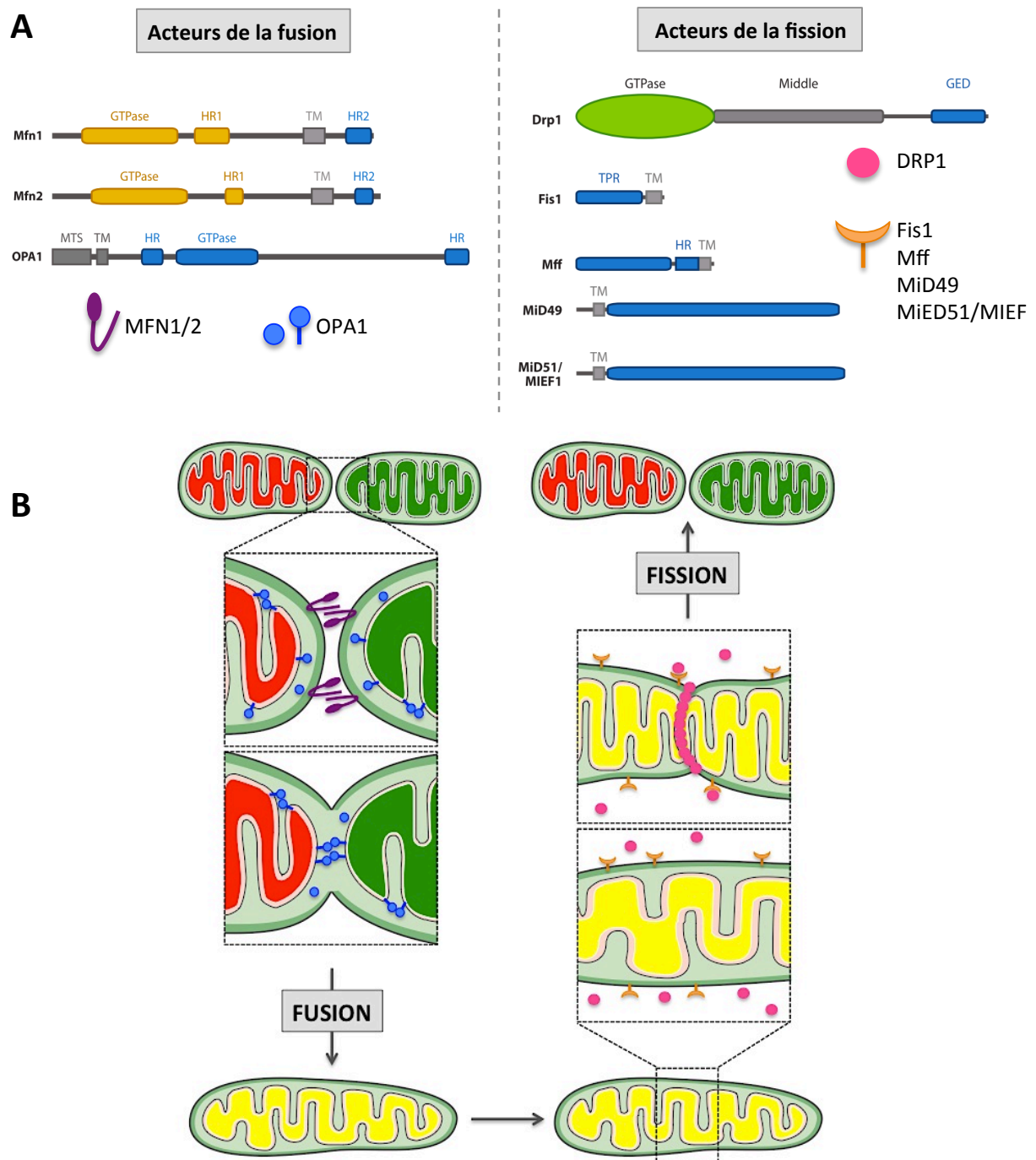
d'un programme transcriptionnel lié au métabolisme énergétique mitochondrial. Sur le plan physiopathologique, une diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans les muscles, le cœur et le cerveau pourrait contribuer respectivement au développement d'un diabète de type 2, d'une insuffisance cardiaque et d'une maladie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer (Garnier et al. 2003; Mootha et al. 2003; Patti et al. 2003; Pedros et al. 2014).

## I. 5. La dynamique mitochondriale

La morphologie des mitochondries est dynamique et variable car elle est modulée selon le type cellulaire et l'état métabolique de la cellule. Lors de leur découverte, il y a une centaine d'année, les mitochondries ont été décrites en forme de « filaments » et de « grains ». Ces premières analyses, qui ont été confirmées par la suite grâce aux progrès de l'imagerie et de la microscopie, témoignent bien de l'hétérogénéité morphologique de cet organelle. Les mitochondries peuvent en effet former un réseau de filaments plus ou moins longs et interconnectés (cellules HeLa, cardiomyocytes, *S.pombe* et *S.cerevisiae*) ou apparaître sous forme d'entités isolées (fibroblastes embryonnaires murins, hépatocytes), voire présenter une morphologie mixte (ostéosarcome) (Collins et al. 2002; Guillou et al. 2005; Kuznetsov and Margreiter 2009; Kuznetsov et al. 2009; T Landes et al. 2010; Margineantu et al. 2002) (Figure 10).

La distribution et la mobilité des mitochondries sont sous la dépendance d'une composante extrinsèque : le réseau de microtubules et d'actine et les machineries de transport associées (DePina and Langford 1999; Ligon and Steward 2000; Schwarz 2013). De plus, leur morphologie est modulée par des événements de fusion et de fission perpétuels qui représentent la composante intrinsèque : la dynamique mitochondriale. Lorsque les événements de fission prédominent, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté. À l'inverse, si la force de fusion est majoritaire, les mitochondries forment un réseau tubulaire et interconnecté (Figures 10 et 11). Les mitochondries peuvent fusionner de façon transitoire ou complète. La fusion dite transitoire (« kiss and run »), suivie très rapidement par des phénomènes de fission, est due à des interactions latérales entre des mitochondries associées à des microtubules distincts qui vont échanger rapidement et partiellement des éléments solubles, sans affecter la morphologie mitochondriale (Liu and Hajnóczky 2009). À l'inverse, la fusion « complète » de mitochondries se déplaçant l'une vers l'autre le long d'un microtubule autorise le mélange de tous les composants mitochondriaux et affecte la morphologie mitochondriale.

Vers la fin des années 1990, des cribles génétiques réalisés chez *Saccharomyces Cerevisiae* ont permis d'identifier les premiers protagonistes de la dynamique mitochondriale. Il s'agit de



**Figure 11 – Acteurs protéiques de la fusion et de la fission mitochondriale, chez l'homme**

(A) Les acteurs protéiques de la fusion et de la fission. (B) La fusion est enclenchée par les Mitofusines (MFN) 1 et 2 au niveau de la membrane externe mitochondriale. Une fois les membranes de deux mitochondries fusionnées, OPA1 permet la fusion des membranes internes de l'organelle. La fission débute par le recrutement de DRP1, une protéine majoritairement cytosolique, au niveau des récepteurs Mff, MiD49, MiD51/MIEF et/ou Fis1 (hFis1). DRP1 oligomérise et permet par action mécanique la courbure des membranes et enfin la fission complète des mitochondries.

Source : Chan DC., 2012.

grandes GTPases conservées chez les eucaryotes au cours de l'évolution, appartenant à la famille des dynamines. Ces dernières sont divisées en 3 groupes, les dynamines classiques, les dynamines apparentées et les protéines apparentées à GBP, et possèdent des domaines protéiques conservés. Les acteurs de la dynamique mitochondriale sont des « dynamines apparentées » et présentent en commun le domaine GTPase (faible affinité pour le GTP et forte capacité à hydrolyser ce nucléotide), le domaine « Middle » (site d'interaction protéine-protéine) et le domaine GTPase Effector Domain GED (interaction avec les domaines GTPase et Middle et oligomérisation de la dynamine pour stimuler son activité GTPase) (Praefcke and McMahon 2004; Smirnova et al. 1999).

### I. 5. 1. La fission mitochondriale : les acteurs et la mécanistique

- Les acteurs essentiels

L'acteur majeur de la fission mitochondriale est la GTPase **DRP1** (Dynammin-Related Protein 1) pour les mammifères. **Dnm1p** et **Dlp1p** sont les orthologues respectifs chez la levure et le vers *C. Elegans*. DRP1 est une protéine soluble, localisée principalement dans le cytoplasme, qui possède un domaine GTPase N-terminal, un domaine Middle et un domaine GTPase Effector Domain (GED) C-terminal, impliqué dans l'auto-assemblage de la dynamine (Chan 2012; Praefcke and McMahon 2004) (Figure 11). La fixation du GTP à la dynamine serait suffisante pour l'auto-assemblage de la protéine et son adressage à la mitochondrie tandis que l'hydrolyse serait cruciale pour finaliser la division mitochondriale par fission des membranes (Cho et al. 2013; Smirnova et al. 2001). Chez les mammifères, la perte de la protéine DRP1 ou la surexpression de mutants dominants négatifs mènent à une hyper-filamentation des mitochondries. Pour initier la fission mitochondriale, la dynamine DRP1 doit être recrutée de manière ponctuelle à la membrane externe (ME) mitochondriale aux futurs sites de fission (Labrousse et al. 1999; Smirnova et al. 2001). Ce recrutement nécessite des acteurs au niveau de la membrane externe. Ce mécanisme est bien décrit chez les levures, mais les rôles de ces acteurs membranaires et leur importance restent encore mal compris chez les mammifères.

Chez les levures, Dnm1p est recruté par **Fis1p**, une protéine ancrée à la ME par un segment transmembranaire C terminal qui possède un domaine cytosolique organisé en TPR (Tétratricopeptide Repeat), impliqué dans les interactions avec des partenaires protéiques (Dohm et al. 2004). Dnm1p interagit préalablement dans le cytosol avec **Mdv1p**, ce dernier va servir d'adaptateur au domaine TPR de Fis1p (Figure 11). Une fois Dnm1p recruté, Fis1p et Mdv1p stimulent l'oligomérisation de la dynamine qui engendre la constriction des membranes mitochondriales en présence de GTP.

Dans les cellules de mammifères, DRP1 est exprimée de manière ubiquitaire mais des niveaux plus élevés sont toutefois détectés dans le cerveau, les muscles squelettiques et les cellules cardiaques (Smirnova et al. 1998). DRP1 est sous forme dimérique ou tétramérique dans le cytosol et s'organise en structure oligomérique en « foci » une fois recruté aux sites de fission à la mitochondrie. Des études récentes montrent que ces « foci » colocalisent avec des points de jonction entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Friedman et al. 2011). Par extrapolation du modèle levure, il a été décrit que **hFis1** (Fis1 chez l'humain) serait responsable du recrutement de DRP1 à la membrane externe. Cependant, la déplétion de hFis1 n'affecte ni le rôle ni le recrutement de la dynamine (Lee et al. 2004). Des nouveaux acteurs de fission, **MFF** (Mitochondrial Fission Factor), **MiD49** (Mitochondrial Dynamics 49) et **MiD51** (Mitochondrial Dynamics 51) ont été récemment proposés comme responsables de l'ancrage de DRP1 à la membrane externe (Figure 11). En effet, ces protéines sont toutes localisées à la membrane externe mitochondriale et leur surexpression induit un recrutement massif de DRP1, responsable de la fission de l'organite (Otera et al. 2010; Palmer et al. 2011). D'autres régulateurs de la fission mitochondriale ont été mis en évidence comme **l'endophiline B1**, **LRRK2** (Leucine-Rich Repeat Kinase 2), **GDAP1** (Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein 1) et **sacsin**. L'endophiline B1 se comporte comme DRP1, elle est transloquée à la ME pour induire la fission mitochondriale lors d'un processus apoptotique (Karbowski et al. 2004). LRRK2 permet le recrutement de DRP1 à la mitochondrie, par des mécanismes mal connus à ce jour et des mutations dans le gène codant cette protéine sont responsables de la forme autosomale dominante de la maladie de Parkinson (PARK8-type) (Mata et al. 2006). GDAP1 entraîne une augmentation de la fragmentation du réseau mitochondrial qui dépend de DRP1, lorsqu'elle est surexprimée (Huber et al. 2013; Niemann et al. 2005). Enfin, sacsin, localisée à la mitochondrie, permet également le recrutement de DRP1 et son interaction avec la dynamine a été démontrée par des expériences d'immunoprécipitation (Anderson et al. 2010; Girard et al. 2012; Otera et al. 2013).

- **La régulation de DRP1**

L'activité de fission de DRP1 est modulée par différentes modifications post-traductionnelles comme la **phosphorylation**, la **S-nitrosylation**, l'**ubiquitylation** et la **sumoylation**. En fonction du type de résidus phosphorylé au niveau du domaine GED de la dynamine, l'activité de DRP1 est différente. En effet, la phosphorylation de la sérine 616 par le complexe Cdk1/cyclin B pendant la mitose, ou de la sérine 600 par la protéine kinase 1 $\alpha$  dépendante de la calmoduline (CaMK1 $\alpha$ ), induit une activation de la fission du réseau mitochondrial par le recrutement de DRP1 à la membrane externe de l'organite (Han et al. 2008; Taguchi et al. 2007). La sérine 637 doit à l'inverse être déphosphorylée par la calcineurine pour constituer un signal de relocalisation de DRP1 à la mitochondrie (Cereghetti



et al. 2008; Cribbs and Strack 2007), alors que sa phosphorylation par la PKA inhibe l'activité GTPasique de DRP1 (Chang and Blackstone 2010). La morphologie du réseau mitochondrial peut être modulée par la S-nitrosylation de DRP1 sur la cystéine 644 (Cys644) par l'oxyde nitrique (NO), qui permet une augmentation de l'activité GTPasique de la protéine et sa dimérisation (D.-H. Cho et al. 2009). L'E3 ubiquitine ligase mitochondriale MARCH-V aurait un rôle pro-fusogène en régulant la dégradation de DRP1 et donc son recrutement au niveau des sites de fission de la mitochondrie (Nakamura et al. 2006). Récemment, DRP1 et hFis1 ont été identifiés comme des cibles de l'E3 ubiquitine ligase Parkin. La surexpression de Parkin induit la dégradation de DRP1 alors que son extinction par interférence ARN est concomitante d'une augmentation de la quantité de la protéine de fission (H. Wang et al. 2011). DRP1 peut être mono-sumoylée par l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9 (Ubiquitinconjugating enzyme 9) et par la SUMO E3 ligase MAPL (Mitochondrial-Anchored Protein Ligase). Cette sumoylation stabilise DRP1 et permet ainsi l'activité de fission mitochondriale, observée entre autres lors de l'apoptose (Braschi et al. 2009; Harder et al. 2004; Wasiak et al. 2007). Inversement, la désomoylation de DRP1 par SENP5 restaure une morphologie mitochondriale normale (Zunino et al. 2007).

- **Existe-t-il une machinerie de fission de la membrane interne ?**

Etant donné que les protéines identifiées jouant un rôle dans la fission mitochondriale sont toutes associées à la membrane externe, il semblerait que la constriction de la membrane externe entraîne celle de la membrane interne. Cependant, la perte de l'activité GTPasique de DRP1 chez *C. Elegans* entraîne une impossibilité de fission de la membrane externe sans perturber celle de la membrane interne (Labrousse et al. 1999). En outre, la fission des membranes externe et interne est désynchronisée dans des cellules HeLa déficientes en endophiline B1 (Karbowski, Jeong, and Youle 2004), ce qui suggère l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne. Certains travaux ont identifié la protéine MTP18, localisée au niveau de la membrane interne, comme un facteur influençant la fission mitochondriale (Tondera et al. 2005). En effet, la surexpression de MTP18 induit la fragmentation des mitochondries alors que sa déplétion entraîne un réseau hyperfilamenteux. D'autre part, Mdm33p (Mitochondrial Distribution and Morphology) chez la levure et MTGM (Mitochondrial Targeting GxxxG Motif) identifié dans différents types de tumeurs de cerveaux de patients, sont situés au niveau de la membrane interne et joueraient un rôle dans la morphologie mitochondriale et la fission de la membrane interne (Messerschmitt et al. 2003; Zhao et al. 2009). En dépit de ces observations, nous ne pouvons pas encore définitivement conclure quant à l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne.



### I. 5. 2. La fusion mitochondriale : les acteurs et la mécanistique

Contrairement à la fission mitochondriale, les deux machineries de fusion des membranes, externes et internes, ont été identifiées. Les Mitofusines 1 et 2 sont responsables de la fusion des membranes externes et la protéine OPA1 des membranes internes (Figure 11). Les fonctions d'OPA1, notamment son rôle dans la régulation de la fusion mitochondriale, ne seront pas exposées dans cette partie mais feront l'objet d'un chapitre abordé en détails dans la partie suivante.

- **Les acteurs essentiels de la membrane externe : les Mitofusines 1 et 2**

Les Mitofusines 1 et 2 (MFN) sont des dynamines (mammifères) responsables de la fusion de la membrane externe des mitochondries (Chen et al. 2003; Eura et al. 2003; Hoppins 2014; Santel and Fuller 2001). Elles possèdent un homologue Fzo1p chez la levure *S. Cerevisiae* (Fritz et al. 2001; Rojo et al. 2002). Les Mitofusines sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal, d'une région coiled-coil HR1 (Heptad Repeat 1), de deux domaines transmembranaires permettant l'ancrage à la membrane externe et d'une dernière région coiled-coil HR2 C-terminale (Rojo et al. 2002; Santel and Fuller 2001). Les Mitofusines sont ancrées à la membrane externe par deux domaines transmembranaires et leurs extrémités C et N-terminales font face au cytosol (Hermann and Shaw 1998; Rojo et al. 2002). Au cours de la fusion, les Mitofusines sont capables d'interagir « en trans » de manière homotypique ou hétérotypique grâce à leurs domaines HR2, permettant ainsi le rapprochement des mitochondries, étape indispensable à la fusion (Chen and Chan 2005; Detmer and Chan 2007; Koshiba et al. 2004). L'hydrolyse du GTP fournirait alors l'énergie nécessaire à la fusion des deux membranes externes (Chen et al. 2003; Ishihara et al. 2004; Meeusen et al. 2004). La perte de fonction de l'une ou des deux isoformes des Mitofusines mène à la fragmentation des mitochondries (Chen et al. 2003). Cependant, malgré une certaine forme de redondance, il existe des différences notables entre MFN1 et MFN2. Tout d'abord, au niveau de leur expression : MFN2 est essentiellement exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau, alors que MFN1 est exprimée de façon équivalente dans tous les tissus (Santel et al. 2003). La perte de MFN1 conduit à des mitochondries sphériques de taille homogène, qui sont libres dans le cytosol. À l'inverse, les mitochondries dépourvues en MFN2 sont sphériques et de taille hétérogène (Chen et al. 2003). D'autre part, la forme recombinante de MFN1 possède une activité GTPasique plus importante et une affinité pour le GTP plus faible que celle de MFN2 (Ishihara et al. 2004). Contrairement à MFN1, une petite fraction de MFN2 est présente aux points de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique et sa perte de fonction induit des perturbations de morphologies des deux organites (De Brito and Scorrano 2008; Merkwirth and Langer 2008).

- **La régulation des Mitofusines**

L'activité des Mitofusines est régulée par interaction avec les protéines de la famille Bcl-2. En effet, la protéine pro-apoptotique Bax est colocalisée avec MFN2 et participe à la fragmentation apoptotique des mitochondries (Karbowski et al. 2002). Cependant, ces protéines interviennent aussi dans le processus de fusion dans des conditions non apoptotiques : la forme inactive de Bak s'associe avec MFN2 et stimule ainsi son activité. La perte de cet agent pro-apoptotique induit une perturbation de la distribution de la dynamine (Hoppins 2014; Karbowski et al. 2007). De plus, d'autres protéines de la famille Bcl-2, les facteurs anti-apoptotiques **Bcl-xL** et **Bcl-2**, interviennent également dans la fusion mitochondriale par interaction physique avec MFN2 (Delivani and Martin 2006).

Trois autres partenaires des Mitofusines ont été identifiés : **MIB**, **MARCH-V** et **Parkin**. MIB (Mitofusin Binding Protein), une protéine de la superfamille des déshydrogénases réductases, est principalement présente dans le cytosol et peut s'associer à la mitochondrie par interaction avec MFN1 et MFN2 (Eura et al. 2006). MIB régule négativement l'activité des Mitofusines et inhibe donc la fusion mitochondriale. MARCH5, une E3-ubiquitine ligase mitochondriale de la membrane externe responsable de l'ubiquitination de Drp1 et Fis1, interagit également avec MFN2 (Nakamura et al. 2006). MARCH5 semble donc avoir un rôle crucial dans la régulation de la morphologie mitochondriale en agissant à la fois sur des acteurs de fission et de fusion mitochondriale. Enfin, l'E3 ubiquitine ligase Parkin participe à la dégradation des MFN1 et 2 (N. C. Chan and Chan 2011; Gegg et al. 2010).

L'expression du gène MFN2 est sous la dépendance de facteurs de transcription et de coactivateurs transcriptionnels impliqués dans la biogenèse mitochondriale. PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  induisent l'expression du gène MFN2 en co-activant le facteur de transcription ERR $\alpha$  et en se fixant sur la séquence promotrice de MFN2 (Cartoni et al. 2005; Liesa et al. 2008; Soriano et al. 2006). Ces voies de régulation transcriptionnelle sont donc impliquées non seulement dans la biogenèse mais également dans la régulation de la fusion mitochondriale.

- **Et les lipides ?**

Enfin, la fusion des membranes mitochondriales requiert également un profil lipidique particulier. En effet, la composition lipidique de la membrane peut affecter l'efficacité de la fusion, comme la formation de micro-domaines qui facilitent la liaison et l'assemblage des complexes protéiques nécessaire pour engendrer ce processus. La mitoPLD (Mitochondrial PLD) est une phospholipase D mitochondriale qui permet la modification *in vitro* et *in vivo* du profil des lipides

mitochondriaux avec une diminution de la quantité de cardiolipine hydrolysée en acide phosphatidique, permettant la fusion des mitochondries dépendante des MFNs (Choi et al. 2006). Du fait de son rôle sur les lipides, la mitoPLD modifierait la composition et la courbure des bicouches lipidiques les rendant plus aptes à la fusion des membranes mitochondriales (Furt and Moreau 2009; Wickner and Schekman 2008).

### **I. 5. 3. La fusion des membranes externes et internes : un phénomène couplé ?**

Bien que la fusion des membranes externes et internes se réalise de manière indépendante (Malka et al. 2005; Meeusen, McCaffery, and Nunnari 2004), ces phénomènes ont lieu de manière synchronisée (Meeusen et al. 2006; Song et al. 2009). Chez les levures *S. Cerevisiae* et *S. Pombe*, la protéine Ugo1p, ancrée dans la membrane externe, coordonne la fusion des deux membranes en jouant le rôle d'adaptateur qui stabilise l'interaction entre Fzo1p (orthologue des Mitofusines) et mgm1p (orthologue d'OPA1) (Hoppins 2014; Sesaki and Jensen 1999). Des mutations de la protéine Ugo1p induisent un défaut de fusion des membranes mitochondriales internes et externes (Hoppins and Nunnari 2009). En dépit du fait qu'aucun homologue de cette protéine n'a été mis en évidence chez les mammifères, la synchronisation des « deux fusions » semble être conservée chez les eucaryotes supérieurs. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de notre équipe démontrant que les protéines OPA1 et les Mitofusines font partie d'un même complexe protéique dans des cellules HeLa (Guillery et al. 2008). De plus, le rôle fusogène d'OPA1 n'est possible qu'en présence de MFN1 (Cipolat et al. 2004).

### **I. 5. 4. Les (dys)fonctions de la dynamique mitochondriale et modèles animaux**

#### *I. 5. 4. 1. Les fonctions de la dynamique mitochondriale, un bref aperçu*

Outre son rôle dans le contrôle de la morphologie des mitochondries, la dynamique mitochondriale influence différentes fonctions de l'organite, phénomène largement décrit dans la littérature (Chan 2012; Detmer and Chan 2007; Jayashankar and Rafelski 2014; McBride and Scorrano 2013; Palikaras and Tavernarakis 2014). La dynamique mitochondriale n'étant pas le sujet d'étude de ma thèse, je n'aborderai que brièvement les fonctions associées à ce mécanisme. Il est clairement établi dans les levures *S. Cerevisiae* et *S. Pombe* que la fragmentation du réseau mitochondrial induite par l'inactivation de l'un des acteurs de la fusion (Fzo1p, Ugo1p ou mgm1p/Msp1p) s'accompagne de la perte du génome mitochondrial (Diot et al. 2009; K. Guan et al. 1993; Guillou et al. 2005; Hermann and Shaw 1998; Jones and Fangman 1992; Meeusen et al. 2006; Pelloquin et al. 1999; Sesaki and Jensen 1999; Wong et al. 2003; Zick et al. 2009). La déplétion ou délétion de l'ADNmt a également été trouvée dans des modèles mammifères invalidés pour les

protéines de fusion Mitofusines et OPA1, ou la protéine de fission DRP1 (Chen and Chan 2010; Parone et al. 2008). Ces observations laissent supposer l'existence de liens très étroits entre le processus de dynamique mitochondriale et le maintien de l'ADNmt.

Au cours de l'apoptose, dans plusieurs types cellulaires, le réseau mitochondrial se fragmente de manière DRP1 dépendante (Arnoult et al. 2005; Breckenridge et al. 2003; Frank et al. 2001; Sugioka et al. 2004). Le modèle actuellement proposé est un lien entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose : la fission rend les cellules plus sensibles à l'apoptose alors qu'à l'inverse, les cellules sont plus résistantes lors de l'augmentation de la fusion mitochondriale (C. Wang and Youle 2009).

De nombreuses études ont révélé l'importance des acteurs de fusion de la dynamique mitochondriale sur la phosphorylation oxydative. La diminution de la quantité protéique de MFN2 et OPA1 *in vitro* entraîne un défaut de respiration cellulaire, la baisse des capacités respiratoires conduite par les complexes I, III et IV et une chute du potentiel de membrane (H. Chen, Chomyn, and Chan 2005a; Pich et al. 2005). Perturber la fusion mitochondriale altérerait donc le métabolisme énergétique. Réciproquement, les mitochondries filamenteuses seraient plus énergétiques (Jakobs et al. 2003; Rossignol et al. 2004; Skulachev 2001). L'existence d'un processus d'hyperfilamentation mitochondriale en réponse à différents stress (SIMH) a été mis en évidence par l'équipe de JC Martinou (Tondera et al. 2009). La SIMH, qui dépend d'OPA1 et de MFN1, conférerait une résistance accrue aux cellules face à un stress grâce à une élévation de la production en ATP. Cette élongation permettrait, dans le cas d'un stress nutritionnel, d'empêcher la dégradation des mitochondries par mitophagie (Gomes et al. 2011).

La mitophagie, ou l'autophagie des mitochondries, joue un rôle d'entretien de la cellule en maintenant un « contrôle qualité » par le renouvellement des organites et en dégradant les agrégats protéiques (Kim et al. 2007; Nakai et al. 2007). La fission des mitochondries permet d'isoler une partie endommagée du chondriome afin de le conduire à la dégradation (Twig et al. 2008). La fusion jouerait également un rôle important dans le contrôle qualité des mitochondries, en permettant le mélange du contenu d'une mitochondrie intacte avec une mitochondrie faiblement endommagée. Ainsi, cette fusion entre les mitochondries permettrait de compléter les déficiences fonctionnelles de certaines d'entre elles en restaurant des éléments manquants ou peu fonctionnels par échange de leur membrane, de leurs contenus protéiques et en ADNmt.

#### *I. 5. 4. 2. Les dysfonctions de la dynamique mitochondriale et modèles animaux*

L'importance fonctionnelle de la dynamique mitochondriale est mise en évidence par son implication dans des maladies neurodégénératives. En effet, de façon surprenante, alors que la

dynamique mitochondriale est un processus ubiquitaire, les seules pathologies connues à ce jour liées aux mutations de ses acteurs provoquent des atteintes neuronales. Des mutations des protéines de fusion MFN2 et OPA1 provoquent respectivement la maladie de Charcot Marie Tooth de type 2A (CMT2A) et l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1). Des mutations de l'acteur de fission GDAP1 sont responsables d'une forme 4A de la maladie de Charcot Marie Tooth (Cuesta et al. 2002; Pedrola et al. 2005) et ont également été identifiées chez des patients atteints de CMT2A (Cassereau et al. 2009). Un seul cas de mutation de la protéine DRP1 a été rapporté, présentant une neuropathie associée à de multiples autres syndromes (concentrations élevées en lactate dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien, problèmes de développement cérébral, atrophie du nerf optique) chez une petite fille décédée 37 jours après sa naissance (Waterham et al. 2007).

L'apparition ces dernières années des modèles animaux a permis une approche plus intégrée de la dynamique mitochondriale et la mise en évidence de la nécessité de ce processus pour le développement et la vie des organismes mammifères. Je présenterai succinctement les modèles murins transgéniques pour l'acteur de fission DRP1 et les acteurs de fusion MFN1, MFN2 et OPA1. Deux modèles de souris transgéniques mutées pour le gène DRP1 ont été développés : un modèle de délétion de l'exon 2 codant une partie du site de liaison au GTP (Ishihara et al. 2009; Wakabayashi et al. 2009) et un modèle de mutation au niveau du domaine GTPase (Wakabayashi et al. 2009). A l'état homozygotes, ces mutations du gène codant DRP1 sont létales aux stades E10,5/E12,5 et E11,5 respectivement. Des lignées de cellules souches, dérivées du premier modèle développé par l'équipe de K. Mihara, présentent des mitochondries agrégées qui possèdent une morphologie tubulaire avec des crêtes mitochondriales qui semblent intactes. La respiration cellulaire et l'ADNmt ne sont pas affectés par la mutation de DRP1. En revanche, les souris dépourvues de DRP1 présentent une élévation de l'apoptose dans le cerveau en formation, une diminution du nombre de synapses et de neurites mais pas d'atteinte dans les autres tissus. Ce modèle murin a donc permis de mettre en évidence le rôle majeur de DRP1 dans le développement du tissu nerveux. Dans le deuxième modèle murin, une augmentation de l'apoptose est observée dans les tubes neuraux aux stades E9,5 et 10,5 dans les embryons *Drp1*<sup>-/-</sup>, mais pas, en revanche, dans les MEF *Drp1*<sup>-/-</sup>. Pour mieux appréhender le rôle de DRP1 dans le cerveau, cette équipe a donc produit une lignée de souris invalidée pour le gène DRP1 spécifiquement dans les neurones du tronc cérébral et du cervelet. Ces souris meurent quelques heures après la naissance et présentent une réduction du volume du cervelet qui serait due à une diminution de la prolifération des cellules de Purkinje et non pas une augmentation de l'apoptose.

L'équipe de David C Chan (Chen et al. 2003) a obtenu des souris transgéniques dans lesquelles l'invalidation des gènes MFN1 et 2 est due à l'excision d'un exon intervenant dans le

domaine GTPase, ce qui empêche la formation de protéines fonctionnelles (Chen et al. 2007; Chen et al. 2003). Leurs premières études montrent également la mort des embryons homozygotes au stade E11,5 de développement. MFN1 et 2 semblent avoir des rôles partiellement redondants au niveau du développement du placenta (Chen et al. 2007; Chen et al. 2003). Pour étudier le rôle des Mitofusines sur le développement, au-delà des stades embryonnaires létaux, les auteurs ont obtenu des souris transgéniques conditionnelles dont l'inactivation des gènes MFN1 et 2 est obtenue au stade embryonnaire E7. Les souris conditionnelles pour l'expression de MFN1 ne présentent pas de défaut particulier. En revanche, les souris conditionnelles pour l'expression de MFN2 spécifiquement dans les neurones du tronc cérébral et du cervelet, présentent des altérations dans le développement et le maintien de la structure cérébelleuse. La perte de la protéine MFN2 ne provoque pas un défaut des mécanismes de mise en place du cervelet, mais induit la mort principalement des cellules de Purkinje. De plus, une petite proportion des mitochondries de muscles des souris *MFN2*<sup>-/-</sup> présente des mutations de l'ADN mitochondrial. Dans des souris doubles mutantes *MFN1*<sup>-/-</sup>/*MFN2*<sup>-/-</sup>, les muscles montrent à la fois une augmentation du nombre de mutations et du nombre de délétions par paire de bases de l'ADN mitochondrial (Chen et al. 2010).

Enfin, trois autres modèles murins d'haploinsuffisance de la pathologie ADOA-1 ont été développés et présentent une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, retrouvée chez les patients, mais à des stades plus précoces. Ces trois modèles seront abordés en détails dans le chapitre dédié à la protéine OPA1 et l'ADOA-1.

## I. 6. Dysfonctions mitochondriales et implication dans des pathologies

La mitochondrie est au cœur de nombreuses fonctions essentielles à la survie cellulaire et contrôle de plus la mort des cellules. Ainsi, des dérégulations de cet organite sont impliquées dans de nombreuses maladies (Federico et al. 2012; Schapira 2012; Swerdlow 2009).

### I. 6. 1. Maladies mitochondriales

Les pathologies mitochondriales héréditaires sont associées à des mutations, délétions et/ou déplétions de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ou à des mutations de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales (Figure 12). Les maladies mitochondriales sont les plus fréquentes des maladies métaboliques avec une incidence globale de 1/5000 naissances et peuvent se traduire par des symptômes isolés ou des manifestations multi-systémiques tels que des atteintes neurologiques, endocrines, cardiaques, musculaires, dermatologiques ou du système digestif (confer tableaux).

**A**

Maladies Mitochondriales	Mutations dans l'ADN mitochondrial	Références
Syndrome de Leigh	Complexe I (ND3, ND4, ND5)	<i>Leigh D. et al., 1951</i>
NARP/Syndrome de Leigh	Complexe V (ATP6) (8993T -> G/C)	<i>Leigh D. et al., 1951</i>
MELAS	ARNTLeu (3243A -> G)	<i>Goto Y. et al., 1990</i>
MERRF	ARNTLys (8344A -> G)	<i>Shoffner JM. et al., 1990</i>
KSS/Syndrome de Pearson	Délétion de l'ADNmt	<i>Grady JP. Et al., 2013</i>
LHON	Complexe I (ND4, ND6) (11778G ->A ; 14484T -> C ; 3460G ->A Complexe III (cytb)	<i>McFarland R. et al., 2007</i>
CPEO	Délétions de l'ADNmt	<i>Grady JP. Et al., 2013</i>

**B**

Maladies Mitochondriales	Mutations dans l'ADN nucléaire	Références
<b>Chaîne respiratoire mitochondriale</b>		
Syndrome de Leigh	Complexe I et assemblage du CI (NDUFS1-4, 6-8, V1, V2, A1, A2, A1, AF1, AF2). Complexe II (SDHA)	<i>Finsterer J. 2008</i>
Tumeurs (Paragangliome, Phéochromocytome)	Complexe II (SDHB, SDHC, SDHD)	<i>Kopetschke R. et al., 2009</i>
Syndrome de Leigh /Encéphalopathie/Défaillance hépatique	Complexe IV et assemblage du CIV (SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15, COX6B1, FASTKD2, ETHE1)	<i>Finsterer J. 2008</i>
Myopathie/Encéphalopathie/Défaillance hépatique	Assemblage du complexe III (BCS1)	<i>Schapira AHV. et al., 2012</i>
<b>Autres</b>		
CMT-2A	Mitofusine 2	<i>Calvo J. et al., 2009</i>
ADOA-1	OPA1	<i>Delettre C. et al., 2000</i>
Ataxie de Friedreich	Frataxine	<i>Friedreich N. et al., 1877</i>
Paraplégie spastique	Paraplégine	<i>Ferreirinha F. et al., 2004</i>
Parkinson	DJ1, PTEN-induced kinase 1	<i>Schapira AHV. et al., 1989</i>
Parkinson juvénile	Parkin	<i>Schapira AHV. et al., 1989</i>
Syndrome de Barth	TAZ (Tafazzin)	<i>Barth PG. Et al., 1983</i>

**Figure 12 – Les maladies mitochondriales**

Les maladies mitochondriales dues à des mutations dans l'ADN mitochondrial (A) ou dans le génome nucléaire (B).

Jusqu'à présent, environ 200 mutations de l'ADNmt ont été répertoriées. Sachant que le génome mitochondrial code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, des mutations de l'ADNmt engendrent principalement des défauts de phosphorylation oxydative et par conséquent des problèmes énergétiques et une augmentation de la production d'EAO (Schapira 2012). Un déficit d'activité du complexe I est la cause la plus fréquente de maladies mitochondriales (8 % des individus) (Rodenburg 2011; Schapira 2012). Seulement 1 % des patients atteints de maladies mitochondriales présentent des défauts du complexe V (Rodenburg 2011; Schapira 2012). En plus des défauts d'activité isolée des complexes, ces mutations pourraient également être responsables d'une déstabilisation des supercomplexes. En effet, quelques études font état de l'importance des supercomplexes dans les tissus nerveux et musculaires car des dysfonctionnements sont détectés dans des myopathies sévères, comme le syndrome de Barth, et dans des phénomènes de neurodégénérescence ou de vieillissement (Gómez et al. 2009; Jefferies 2013; Merkwirth et al. 2012).

Des mutations de gènes qui ne sont pas impliqués dans la phosphorylation oxydative donnent également naissance à de nombreuses autres pathologies. Par exemple, des mutations du gène codant MFN2 sont responsables de la maladie de CMT2A. Cette pathologie, qui fait partie du groupe des neuropathies héréditaires motrices et sensibles les plus courantes (1 personne sur 2500), conduit à une atteinte progressive des nerfs périphériques et s'accompagne d'une amyotrophie distale des membres inférieurs (Cartoni and Martinou 2009; Zuchner et al. 2004). De même, des mutations du gène codant PINK1 ont été trouvées dans une forme autosomale récessive familiale de maladie de Parkinson (Valente et al. 2004). La protéine PINK1 aurait un rôle dans le métabolisme des EAO, l'homéostasie calcique et dans le maintien de l'ADN mitochondrial (Abramov et al. 2011; Gandhi et al. 2009; Gegg et al. 2010). De plus, des mutations du gène codant la protéine E3 ligase Parkin sont responsables de la maladie de Parkinson chez des personnes ayant moins de 30 ans et causent des dysfonctions des mitochondries, responsables d'un stress oxydant (Greene et al. 2003; Grünewald et al. 2010; Müftüoglu et al. 2004). Comme dernier exemple, les protéines Huntingtine mutantes, responsables de la Chorée de Huntington, peuvent s'accumuler à la membrane externe mitochondriale, empêcher le trafic axonal des organites et donc l'apport d'ATP au niveau des synapses (Orr et al. 2008). De plus, en interagissant avec le co-facteur PGC-1 $\alpha$ , les protéines mutantes inhibent le processus de biogenèse mitochondriale et induisent par conséquent des déficiences énergétiques, voire un excès de radicaux libres (St-Pierre et al. 2006). Bien que les protéines mutées dans ces pathologies ne soient pas en lien direct avec la chaîne respiratoire mitochondriale, l'altération du métabolisme oxydatif en général représente un effet collatéral et joue un rôle non négligeable dans l'étiologie de la plupart des maladies neurodégénératives (Federico et al. 2012; Schapira 2012; Swerdlow 2009).



### I. 6. 2. Mitochondries et rétinopathies

Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) sont des neurones dont les axones se projettent jusque dans le thalamus, zone du cerveau responsable du traitement de l'information visuelle provenant de la rétine (Carelli et al. 2004). La partie axonale de la cellule au niveau de la rétine est démyélinisée et présente des varicosités riches en mitochondries (Wang 2003). Ces zones semblent nécessiter une forte quantité d'énergie locale, suggérée importante pour la transmission du signal. Les axones des 1,2 millions de CGR se regroupent pour former le nerf optique, dont la sortie de la rétine s'effectue à angle droit, ce qui engendre une contrainte structurale de la cellule : l'axone forme un « coude » (Prasad and Galetta 2011; Alfredo et al. 2014). La partie de l'axone qui est au niveau du nerf optique est myélinisée et pauvre en mitochondries. Ainsi, les CGR sont des neurones particulièrement sensibles à des troubles de l'apport en oxygène, ont un axone très long avec une partie démyélinisée, et qui de fait demandent une grande quantité d'énergie pour la conduction du message nerveux. Outre leur sensibilité à des défauts métaboliques, ces neurones sont confrontés à des agressions extérieures comme les UVs, susceptibles d'engendrer un stress oxydatif pouvant entraîner leur dégénérescence (Lenaers et al. 2009). Par conséquent, des défauts du fonctionnement mitochondrial peuvent engendrer des rétinopathies.

Deux formes non syndromiques de neuropathie optique ont été abondamment décrites : la maladie de Leber (Leber's Hereditary Optic Neuropathie, LHON) et l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) (Maresca et al. 2013). LHON est une pathologie caractérisée par des mutations de l'ADN mitochondrial au niveau des gènes codants des sous-unités du complexe I (ND1, ND4 ou ND6), présentes chez 90 % des patients (Carelli et al. 2004; Yu-Wai-Man et al. 2011). Les patients, souvent des hommes jeunes, ont une perte brutale, bilatérale ou séquentielle, de la vision centrale qui aboutit dans la majorité des cas à une cécité bilatérale. L'ADOA-1 est responsable d'une perte progressive et bilatérale de la vision centrale chez les jeunes enfants, causée par la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine. Cette pathologie est caractérisée par des mutations dans le gène codant la protéine OPA1 (Carelli et al. 2004; Yu-Wai-Man et al. 2011). Nous aborderons la pathologie de l'ADOA-1 plus en détail dans la partie suivante. Ces deux neuropathies optiques présentent une pénétrance incomplète laissant penser que des facteurs environnementaux ou des gènes modificateurs de la sévérité peuvent être responsables des différences symptomatiques observées. Des formes syndromiques de ces deux pathologies avec des atteintes extra-oculaires ont été rapportées, comme des myopathies, une ataxie ou des dystonies (Amati-Bonneau et al. 2008; Bruyn and Went 1964; Hudson et al. 2008; Novotny et al. 1986). De plus, les atteintes oculaires décrites dans la maladie de LHON ou de l'ADOA-1 ont été détectées chez des patients atteints d'autres pathologies mitochondriales, comme la maladie de MELAS (Mitochondrial

Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) ou le syndrome de Leigh (Maresca et al. 2013).

Deux autres gènes responsables d'autres formes d'atrophies optiques ont été identifiés, OPA3 et TMEM126a (OPA7) (Hanein et al. 2009; Owczarek-Lipska et al. 2011). Les mutations du gène nucléaire OPA3 sont responsables de l'atrophie optique dominante avec cataracte (AODC) (Reynier et al. 2004). Il s'agit d'une pathologie autosomique dominante caractérisée par une baisse de l'acuité visuelle et une opacification du cristallin. Le gène OPA3 localisé en 19q13.2-q13.3 contient 2 exons et code une protéine ubiquitaire de 179 acides aminés dont la fonction est encore inconnue. La protéine OPA3 comporte une séquence d'adressage et a été localisée, comme la protéine OPA1, dans la membrane interne mitochondriale (Grau et al. 2013). Le gène TMEM126a, ou OPA7, code pour une protéine de la membrane interne mitochondriale dont la fonction est encore inconnue à ce jour. Les mutations de ce gène aboutissent à une forme non syndromique d'atrophie optique récessive (Hanein et al. 2009).

Des anomalies optiques peuvent s'ajouter aux symptômes de pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer. En effet, des problèmes d'acuité visuelle (Jones and Fangman 1992), de perceptions des couleurs (Silva et al. 2005) et de dégénérescence du nerf optique (Archibald et al. 2009) ont été décrits chez les patients Parkinsoniens. De même, l'analyse des rétines post mortem de patients atteints de la MA montre une diminution du nombre de cellules ganglionnaires de la rétine (Hinton et al. 1986; Sadun and Bassi 1990), données confirmées par de nombreuses études récentes (Maresca et al. 2013).

### **I. 6. 3. Les mitochondries : cibles thérapeutiques**

Comme nous venons de le voir, des dérégulations des mitochondries sont impliquées dans l'étiologie de nombreuses maladies, ce qui en fait une cible de choix pour des stratégies thérapeutiques. Le coenzyme Q10 (CoQ) a été utilisé comme stratégie thérapeutique pour de nombreuses pathologies mitochondriales (Geromel et al. 2002). Cette molécule permet le transport d'électrons des complexes I et II jusqu'au complexe III. Ainsi, des défauts de l'activité du complexe I, observés dans les rétinoopathies LHON et ADOA-1 ou dans des maladies neurodégénératives, peuvent être compensés par un ajout de Coenzyme Q. Certains travaux sur l'utilisation du Coenzyme Q dans le traitement de LHON ont été publiés (Huang et al. 2002), mais le manque d'études cliniques d'envergure avec une cohorte conséquente de patients ne permet pas de conclure sur les effets bénéfiques de cette molécule. De plus, le Coenzyme Q est très lipophile ce qui rend difficile son accès à la mitochondrie quand le traitement est administré par voie orale (Geromel et al. 2002). Cependant, d'autres études cliniques montrent que le Coenzyme Q permet de ralentir la progression de la

maladie de Parkinson juvénile (Kerr 2010; Storch et al. 2007). Enfin, une combinaison de coenzyme Q10 associé à la vitamine E améliore l'état neurologique des patients atteints de l'ataxie de Friedreich (Hart et al. 2005).

L'idebenone, un analogue du Coenzyme Q, a également fait l'objet de phases cliniques notamment pour la maladie de LHON (Mashima, Hiida, and Oguchi 1992). De nombreux rapports ont montré les effets positifs de l'idebenone sur les symptômes des patients atteints de LHON, comme l'amélioration de l'acuité visuelle, surtout chez les patients pris en charge dès le début du développement de la maladie (Carelli et al. 1998; Klopstock et al. 2011; Mashima et al. 2000; Newman 2011; Sabet-Peyman et al. 2012; Yu-Wai-Man et al. 2014). Des travaux récents ont mis en évidence l'importance de maintenir l'idebenone sous sa forme réduite, non toxique, qui est plus efficace (Haefeli et al. 2011). Les formes réduites seraient régénérées par l'activité de l'enzyme NQO1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1) (Haefeli et al. 2011). Les effets bénéfiques de l'idebenone ayant été largement documentés, cette molécule a été utilisée pour la première fois très récemment chez 7 patients atteints d'ADOA-1 (Barboni et al. 2013). Les résultats, obtenus après un an de traitement, indiquent que 4 patients sur 7 présentent une augmentation de l'acuité visuelle. Ces données restent encourageantes pour la prise en charge de la pathologie de l'ADOA-1, mais restent à être vérifiées sur une cohorte plus importante.

Une nouvelle molécule nommée EPI-743, une quinone  $\alpha$ -tocotrienol, a montré des qualités antioxydantes *in vitro* (Shrader et al. 2011). Dans une étude récente composée de 5 patients atteints de LHON, 4 d'entre eux voient un arrêt de la progression de la maladie voire une amélioration des fonctions visuelles (Sadun et al. 2013). Cette piste encourageante reste à être testée lors d'études cliniques plus poussées.

D'autres stratégies thérapeutiques émergent, visant à réguler la transcription des facteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale. En effet, le cofacteur PGC1 $\alpha$  est un régulateur important de l'activité mitochondriale. Par son interaction directe avec SIRT1 (sirtuine 1), PGC1 $\alpha$  est déacétylé, ce qui augmente son activité et donc la transactivation de gènes cibles (Rodgers et al. 2005). Il interagit notamment avec le facteur de transcription PPAR $\gamma$  (peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$ ). Les drogues rosiglitazone, pioglitazone et troglitazone, utilisées dans le traitement du diabète de type 2, sont des activateurs du récepteur PPAR $\gamma$ . Un autre composé de la famille des phénols naturels a fait l'objet de nombreuses études cliniques : le Resvératrol. Il active SIRT1 et donc l'activité de PGC1 $\alpha$ , ce qui augmente la biogenèse mitochondriale, diminue l'insulino-résistance et rend les animaux résistants aux régimes obésitogènes (Howitz et al. 2003; Lagouge et al. 2006). Le Resvératrol et le benzafibrate, un autre agoniste de PGC1 $\alpha$ , ont montré un rôle protecteur

chez les animaux modèles de la maladie de Parkinson (Khan et al. 2010), de Huntington (Ho et al. 2010; Maher et al. 2011), d'Alzheimer (Anekonda and Reddy 2006) et de myopathies mitochondriales (Wenz et al. 2008).

Enfin, ces dernières années, la thérapie génique a été utilisée pour remplacer le gène «muté» chez les patients par une version sauvage, à l'aide d'un vecteur AAV (adeno-associated virus) (Cwerman-Thibault et al. 2014; Manfredi et al. 2002; Qi et al. 2007; Yu-Wai-Man et al. 2011). Par exemple, cette stratégie a été utilisée dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la maladie de Leber (LHON) par transfection des cellules avec un vecteur AAV codant le gène humain SOD2 (superoxyde dismutase 2), une enzyme antioxydante localisée à la matrice mitochondriale (Qi et al. 2004, Qi et al. 2007). Dans ces conditions, les auteurs observent une diminution de la mort des CGR par apoptose associé à une diminution de la dégénérescence des fibres du nerf optique. Une autre stratégie est l'expression allotopique de gènes mitochondriaux par la machinerie transcriptionnelle présente dans le noyau. La preuve de concept a notamment été démontré chez le rat modèle de la pathologie de LHON, muté pour le gène mitochondrial ND4 (m.11778A>G) (Ellouze et al. 2008). L'expression de ND4 par une technique d'électrolocation *in vivo*, à la place des vecteurs AAV, permet notamment une amélioration des fonctions visuelles.

## II. (Dys)fonctions d'OPA1 et Atrophie Optique Dominante de type I (ADOA-1)

Mon projet de thèse s'est articulé autour de la pathologie de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) et du produit du gène responsable de cette rétinopathie, la dynamine OPA1. L'ADOA-1 est, avec la neuropathie optique de Leber (LHON), la forme majoritaire d'atrophie optique héréditaire à caractère dominant (Landes et al. 2010). Afin de mieux comprendre la pathologie de l'ADOA-1, je traiterai en premier lieu les fonctions de la protéine fusogène OPA1.

### II. 1. OPA1 : protéine mitochondriale responsable de l'ADOA-1

OPA1 est un acteur essentiel dans la régulation de la dynamique mitochondriale et intervient également dans de nombreuses fonctions de la mitochondrie. L'activité de la protéine OPA1 est finement régulée, en fonction des signaux environnementaux ou intracellulaires (Landes et al. 2010).

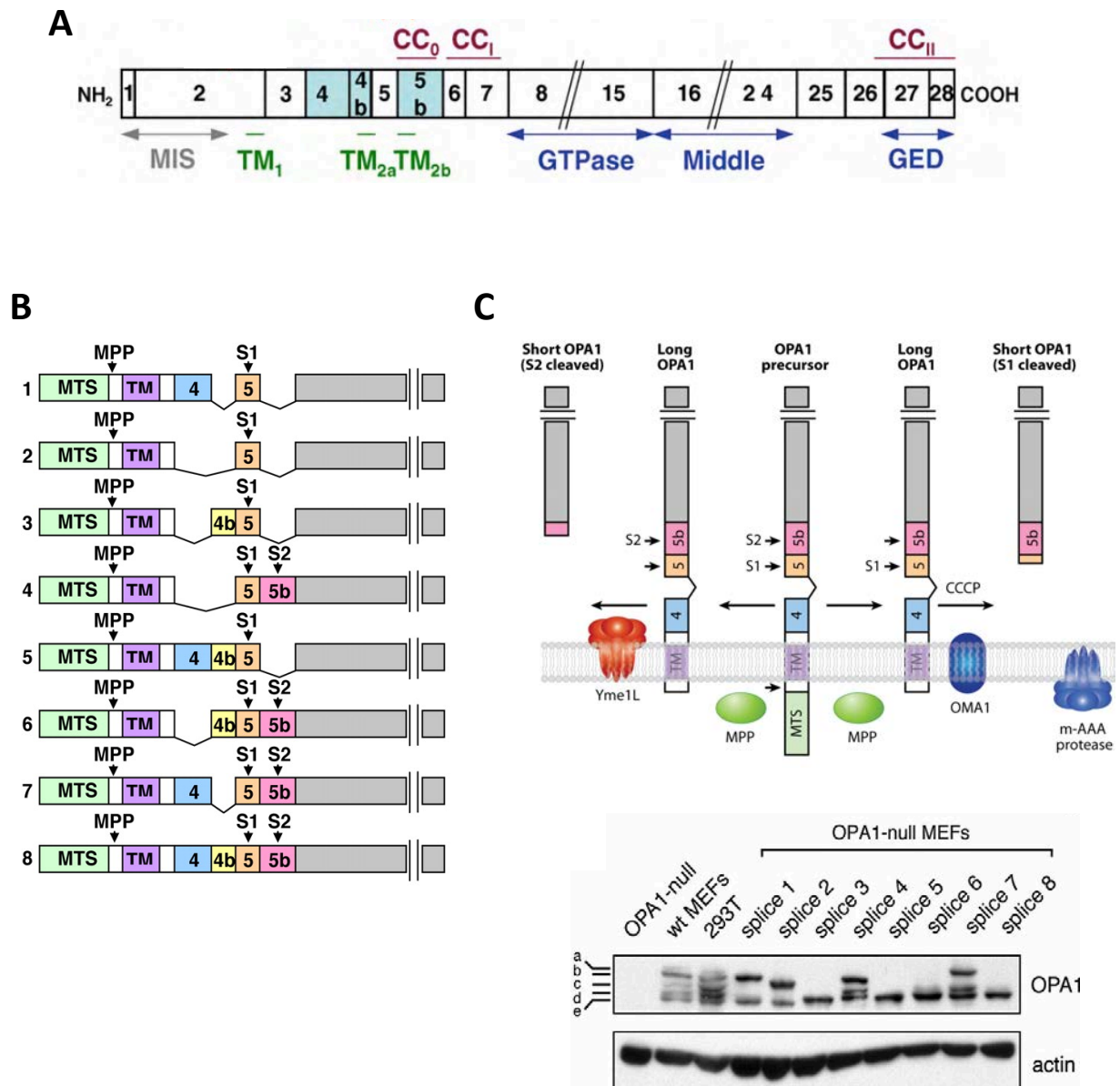
#### II. 1. 1. OPA1 et régulations post-traductionnelles

##### *II. 1. 1. 1. OPA1 : forme courte ou forme longue, quelles fonctions ?*

La dynamine OPA1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui aboutissent à la production de formes courtes ou longues, toutes deux essentielles pour induire la fusion des membranes internes. En fonction du statut énergétique de la cellule, du potentiel membranaire des mitochondries, de l'induction de l'apoptose ou de la perte de l'ADN mitochondrial, l'équilibre entre les isoformes d'OPA1 est finement régulé.

- **Les isoformes d'OPA1**

Chez l'homme, le cadre de lecture d'OPA1 possède 31 exons dont 3 alternativement épissés (4, 4b et 5b) ce qui donne 8 ARNm possibles. Bien qu'OPA1 ait une expression ubiquitaire, celle-ci varie de façon différentielle suivant les tissus. De forts niveaux d'expressions des ARNm d'OPA1 sont visibles dans la rétine, le cerveau, le foie, le cœur et le pancréas (Akepati et al. 2008; Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2001). Après la séquence d'import à la mitochondrie (MIS pour Mitochondrial Import Sequence ou MTS pour Mitochondrial Targeting Signal) en N-terminal, la protéine OPA1 présente un domaine transmembranaire (TM1) puis deux autres domaines hydrophobes codés par les exons 4b et 5b (TM2a et TM2b), un domaine GTPase, un domaine Middle et un domaine GED



**Figure 13 – Les formes longues et courtes de la protéine OPA1**

(A) Représentation schématique de la protéine OPA1 et des domaines tels que le MIS (Mitochondrial Import Signal), TM (transmembranaire), GTPase et GED (GTPase Effector Domain). (B) Les trois exons 4, 4b et 5b sont alternativement épissés, donnant naissance à 8 variants d'ARN messagers (ARNm) d'OPA1 (ici schéma des protéines). Les sites MPP, S1 et S2 représentent les zones de clivages de la dynamine par différentes protéases. (C) Exemple de maturation protéolytique d'OPA1 avec les enzymes YME1L, OMA1 et la protéase m-AAA, et immunoblots représentant la protéine OPA1 (formes courtes ou longues) en fonction des différents variants exprimés dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs). Cinq bandes sont observées dans les MEFs sauvages, notées de a à e.

Sources : Landes T. et al., 2010; Chan DC. et al., 2012; Song Z. et al., 2007.

(GTPase Effector Domain) en C-terminal. La protéine présente également des domaines coiled-coil (CC) I et II respectivement codés par les exons 6-7 et 27-28 (domaine GED). Ces domaines pourraient être responsables de la formation des complexes homotypiques d'OPA1 (Akepati et al. 2008). De plus, un domaine CC<sub>0</sub> est présent au niveau de l'exon 5b, donc uniquement dans les variants d'épissage contenant cet exon (Figure 13).

La protéine OPA1 générée d'après les différents ARNm possède 2 sites de clivage, S1 et S2, respectivement localisés au niveau des séquences codées par l'exon 5 et l'exon 5b (Eura et al. 2006; Griparic et al. 2007; Song et al. 2007). Toutes les protéines OPA1 produites présentent le site de clivage S1, alors que le site S2 est présent dans les isoformes générées à partir des variants d'épissage qui ont conservé l'exon 5b (Figure 13). Les isoformes d'OPA1 sont ancrées à la membrane interne mais le clivage de la protéine, au niveau des sites S1 ou S2, induit une forme courte dépourvue de TM1. Ces formes courtes sont attachées de façon périphérique à la MI ou libre dans l'IMS (Frezza et al. 2006; Olichon et al. 2002; Satoh et al. 2003). Dans la plupart des tissus humains et murins, 5 isoformes protéiques d'OPA1 sont détectées : 2 longues (isoformes a et b) et trois courtes (isoformes c, d et e). Les protéases impliquées dans la maturation d'OPA1

La maturation protéolytique d'OPA1 est cruciale pour la régulation de l'activité fusogène de la protéine. En effet, la disparition des formes longues de la dynamine, après un traitement par un agent découplant qui fragmente le réseau mitochondrial, semble indiquer l'importance de ces isoformes pour le processus de fusion mitochondriale (Griparic et al. 2007; Guillery et al. 2008; Landes et al. 2010). Néanmoins, les études sur des mutants des sites de clivage S1 et S2 soulignent également l'importance des formes courtes dans le contrôle de la morphologie mitochondriale (Griparic et al. 2007; Song et al. 2007; Zick et al. 2009). Finalement, la réintroduction combinée de différents variants d'OPA1 dans les MEFs indique la nécessité de la présence d'au moins une forme longue et une forme courte d'OPA1 pour fusionner les mitochondries dans des conditions basales (Song et al. 2007). Il a été démontré dans les levures une interaction entre les formes longue et courte de la dynamine, pour permettre son oligomérisation, nécessaire à son activité fusogène (Meeusen et al. 2006; Zick et al. 2009).

- **Les protéases mitochondriales impliquées dans le clivage d'OPA1**

De nombreuses protéases mitochondriales sont impliquées dans le clivage d'OPA1 (Figure 13). Une fois la protéine OPA1 correctement adressée à la membrane interne, le signal d'import à la mitochondrie est clivé par la peptidase mitochondriale matricielle (MPP), ce qui génère la forme longue de la dynamine. Des clivages additionnels peuvent intervenir au niveau des sites S1 et S2 (Martinelli and Rugarli 2010). **La protéase PARL** (Presenilin Associated Rhomboïd Like protease),

localisée dans la membrane interne mitochondriale, est impliquée dans le clivage d'une faible quantité d'OPA1 (<4 %), ce qui génère une forme soluble d'OPA1 peu abondante (Frezza et al. 2006). Par conséquent, l'extinction de la protéase PARL n'affecte pas réellement le ratio de la forme longue et courte d'OPA1 (Griparic et al. 2007; Guillery et al. 2008).

**La m-AAA protéase** (ATP-depedent protease) est ancrée dans la membrane interne mitochondriale où son domaine catalytique fait face à la matrice. Chez l'homme, cette protéase forme un complexe homo-oligomérique composé uniquement de **AFG3L2** (ATPase family gene 3-like 2 polypeptide) ou hétéro-oligomérique avec les protéines **AFG3L2** et la **Parapléline** (Casari et al. 1998; Duvezin-Caubet et al. 2007). La Parapléline induit un clivage d'OPA1 au niveau du site S1. Bien que la surexpression de cette protéase stimule le clivage d'OPA1, la perte de la Parapléline dans des fibroblastes de souris ne perturbe pas le patron d'expression de la dynamine OPA1, ce qui suggère qu'une faible proportion de la dynamine est clivée par cette protéase (Eura et al. 2006; Guillery et al. 2008). **Les prohibitines 1 et 2** (PHB1 ou 2) participent à la régulation des formes d'OPA1 de manière indirecte car elles inhibent l'activité des m-AAA protéases. Les isoformes courtes s'accumulent au détriment des isoformes longues dans des fibroblastes de souris invalidées pour PHB2 (Merkwirth and Langer 2009).

**La protéase YME1L**, une **i-AAA protéase** (ATP-depedent protease), est responsable du clivage de la protéine OPA1 au niveau du site S2 (Anand et al. 2014; Griparic et al. 2007; Shah et al. 2000; Song et al. 2007).

Récemment, la métalloprotéase indépendante de l'ATP, **OMA1**, a été impliquée dans la production d'isoformes courtes d'OPA1. Les formes courtes et longues d'OPA1 sont présentes dans des MEFs *Oma1*<sup>-/-</sup> or les isoformes c et e, induites par le clivage au niveau du site S1, sont absentes. OMA1 est donc impliqué de manière constitutive dans le clivage d'OPA1 au site S1. Toutefois, la morphologie du réseau mitochondrial dans les MEFs *Oma1*<sup>-/-</sup> est normale, suggérant que les formes c et e ne sont pas essentielles au processus de fusion (Ehse et al. 2009; Head et al. 2009; Quirós et al. 2012). En plus du clivage protéolytique d'OPA1 à l'état basal, OMA1 intervient dans la maturation protéolytique de la dynamine en cas de stress cellulaire comme la présence d'un agent découplant (CCCP), l'augmentation de la température (42°C) ou lors d'un stress oxydant (peroxyde d'hydrogène) (Baker et al. 2014; Ehse et al. 2009; Head et al. 2009; Quirós et al. 2012). A l'inverse, le clivage d'OPA1 en condition de stress (UVs ou traitement à la cycloheximide) est inhibé par la protéine **SLP-2** (Stomatin-like protein 2) (Da Cruz et al. 2008; Tondera et al. 2009).



### *II. 1. 1. 2. OPA1 et acétylation*

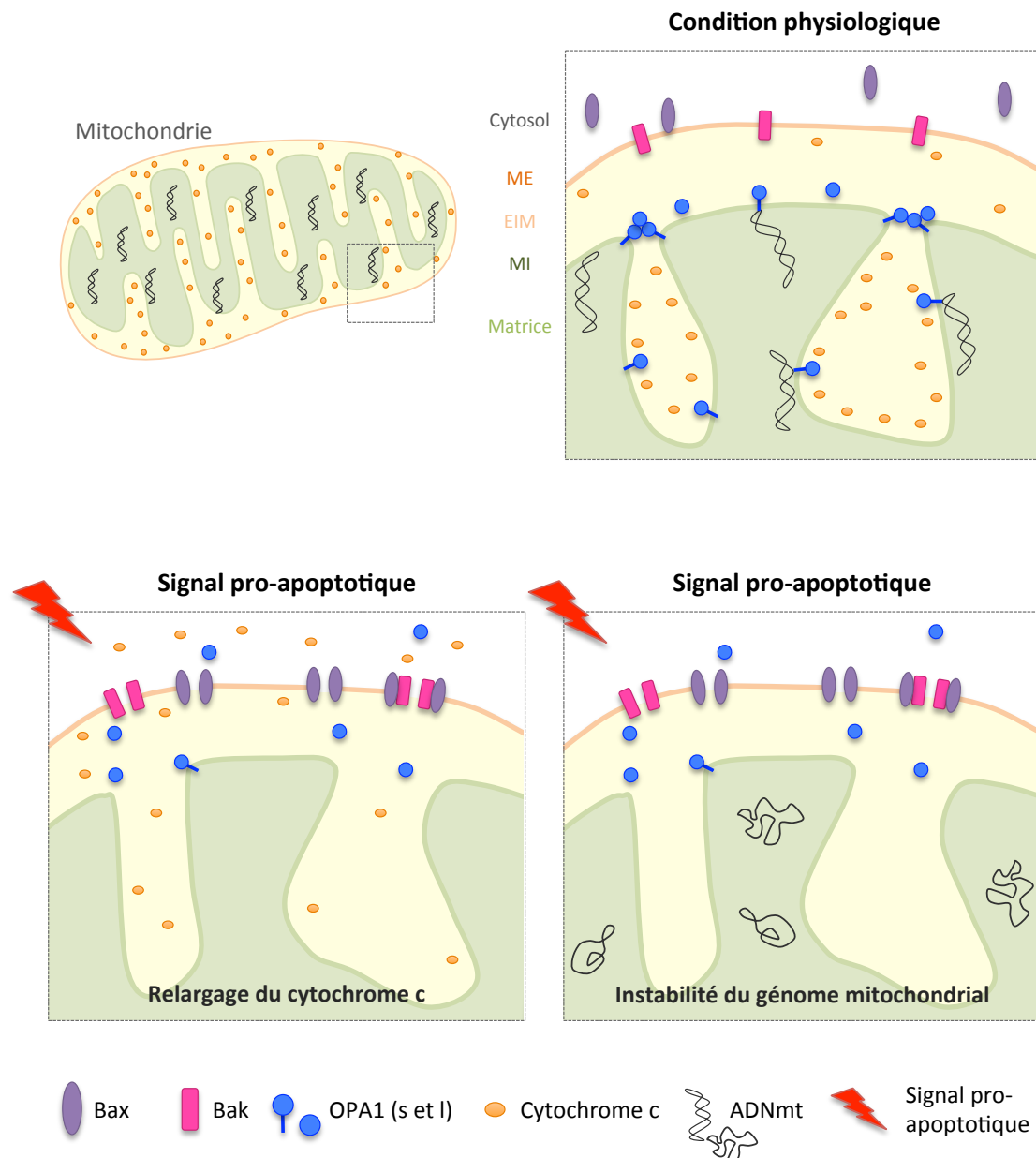
Les récents travaux de Sadhana A. Samant en 2013 montrent que la protéine OPA1 est hyper-acétylée, au niveau des lysines 926 et 931, en condition de stress dans des cellules cardiaques, ce qui engendre une diminution drastique de son activité GTPase (Samant et al. 2014). La déacétylation des protéines mitochondriales serait prise en charge par les déacétylases de la famille des Sirtuines, SIRT3, 4 et 5 qui sont mitochondriales. Selon les travaux de Sadhana A. Samant, SIRT3 serait impliquée dans la déacétylation de la dynamine OPA1. Cette déacétylase est présente dans la matrice mitochondriale et à la membrane interne, notamment au niveau des crêtes mitochondriales. La déacétylation d'OPA1 permet de réactiver son domaine GTPase et de retrouver un réseau mitochondrial filamenteux dans les cellules. SIRT3 protège donc les cellules d'un stress en régulant la dynamique mitochondriale par l'intermédiaire de la protéine fusogène OPA1.

### **II. 1. 2. Les fonctions d'OPA1**

#### *II. 1. 2. 1. OPA1, l'acteur de la fusion des membranes internes mitochondriales*

La fusion de la membrane interne est induite par OPA1, une protéine codée par le génome nucléaire, identifiée au laboratoire comme l'homologue humain de *mgm1p* chez *S. Cerevisiae* et *Msp1p* chez *S. Pombe* (Berger and Yaffe 1996; Delettre et al. 2000a; Jones and Fangman 1992; Pelloquin et al. 1998). OPA1 est ancrée au niveau de la membrane interne mitochondriale et fait face à l'espace intermembranaire (Gripic et al. 2004; Misaka et al. 2002; Olichon et al. 2002; Satoh et al. 2003) (Figure 11).

L'extinction de la protéine OPA1 par interférence ARN dans les cellules HeLa et Cos-7, et l'invalidation du gène *OPA1* dans des MEFs induisent la fragmentation du réseau mitochondrial (Gripic et al. 2007; Gripic et al. 2004; Olichon et al. 2003). À l'inverse, la surexpression d'OPA1 dans des MEFs et des NIH3T3, qui possèdent un réseau mitochondrial initialement fragmenté, provoque l'élongation de mitochondries (Cipolat et al. 2004; Olichon et al. 2002). Ces données mettent en évidence le rôle fusogène d'OPA1, rôle confirmé par des études montrant l'incapacité des mitochondries dépourvues d'OPA1 à fusionner (Arnoult 2010; Chen et al. 2005a; Gripic et al. 2007). De façon surprenante, la surexpression de cette dynamine dans des cellules possédant un réseau mitochondrial originellement filamenteux, provoque la fragmentation des mitochondries sans inhibition de fusion (Chen and Chan 2005; Cipolat et al. 2004; Gripic et al. 2004; Misaka et al. 2002). La fragmentation pourrait être causée par une activation de la fission due à un excès de fusion ou d'une grande quantité d'OPA1 favorisant le processus de fusion transitoire.



**Figure 14 – OPA1, jonction des crêtes, maintien de l'ADN mitochondrial et apoptose**

En condition physiologique, OPA1 est ancrée dans la membrane interne et permet la séquestration du cytochrome c dans l'espace intra-crêtes. OPA1 intervient dans le maintien du génome mitochondrial (ADNmt) par l'interaction de l'ADN avec le fragment transmembranaire de la dynamine. Suite à un signal apoptotique, la membrane externe est perméabilisée par l'ouverture de canaux, comme Bax/Bak, le cytochrome c et d'autres agents pro-apoptotiques sont relargués dans le cytosol.

*Schéma adapté de Elachouri G. et al., 2011; Olichon A. et al., 2002; Landes T. et al., 2010.*

### *II. 1. 2. 2. OPA1, jonction des crêtes et apoptose*

En plus de la fragmentation du réseau mitochondrial, la perte de la protéine OPA1 provoque une apoptose spontanée ou une augmentation de la sensibilité à l'apoptose (Lee et al. 2004; Olichon et al. 2003). Inversement, la surexpression d'OPA1 protège de la mort induite par divers agents pro-apoptotiques, en inhibant le relargage du cytochrome c dans le cytosol (Frezza et al. 2006). Il a été montré que le rôle anti-apoptotique d'OPA1 est indépendant de son action fusogène ; il s'exerce grâce à son rôle dans le remodelage des crêtes mitochondriales (Cipolat et al. 2004; Frezza et al. 2006). Les formes courtes solubles et longues de la dynamine participeraient à l'élaboration de complexes au niveau de la jonction des crêtes mitochondriales, ce qui permettrait leur maintien dans une forme dite « fermée » en conditions physiologiques (Darshi et al. 2011; Frezza et al. 2006) (Figure 14). Cette conformation permettrait la séquestration du cytochrome c dans l'espace intra-crêtes, où il joue son rôle de transporteur d'électrons pour la chaîne respiratoire mitochondriale. Les isoformes d'OPA1 contenant l'exon 4 sont importantes pour la fusion mitochondriale, alors que les formes contenant les exons 4b et 5b interviennent dans la régulation du relargage du cytochrome c, au niveau de la jonction des crêtes (Olichon et al. 2007). L'induction de l'apoptose mènerait à la dissociation des complexes d'OPA1, à « l'ouverture » des jonctions des crêtes et par voie de conséquence à la mobilisation du cytochrome c de l'espace intra-crêtes vers l'espace intermembranaire (Frezza et al. 2006; Thomas Landes, Leroy, et al. 2010; S. Lee et al. 2007; Scorrano et al. 2002) (Figure 14). L'expression d'un mutant d'OPA1 (Q297A) qui stabilise son organisation en oligomères, empêche le relargage du cytochrome c et inhibe l'apoptose (Yamaguchi et al. 2008). OPA1 jouerait donc un rôle de séquestration du cytochrome c.

### *II. 1. 2. 3. OPA1 dans le maintien de l'ADN mitochondrial*

Dans les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, il est clairement établi que la fragmentation du réseau mitochondrial induite par l'inactivation de l'un des acteurs de la fusion (Fzo1p, Ugo1p ou mgm1p/Msp1p) s'accompagne de la perte du génome mitochondrial (Diot et al. 2009; K. Guan et al. 1993; Guillou et al. 2005; Hermann et al. 1998; Jones and Fangman 1992; Meeusen et al. 2006; Pelloquin et al. 1999; Rapaport et al. 1998; Sesaki and Jensen 1999; Wong et al. 2003; Zick et al. 2009). Ces observations laissent supposer l'existence de liens très étroits entre le processus de fusion et le maintien du génome mitochondrial.

Dans des MEF invalidées pour la protéine OPA1, la quantité d'ADNmt est diminuée (Chen and Chan 2010; Chen et al. 2007). Le rôle d'OPA1 au niveau du maintien de l'ADNmt pourrait s'exercer de façon « indirecte » par le biais de son effet sur la structure de la membrane interne mitochondriale.

La perte d'OPA1, qui provoque comme celle de son homologue de levure une déstructuration des crêtes, pourrait modifier l'ancrage du génome à la membrane interne, et par conséquent perturber sa réplication et sa stabilité (Griparic et al. 2004; Olichon et al. 2003; Sesaki and Jensen 1999) (Figure 14). D'autre part, l'effet d'OPA1 sur le maintien du génome mitochondrial pourrait être plus direct. L'équipe de Guy Lenaers a en effet proposé qu'OPA1 lierait de manière directe les nucléoïdes à la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de la séquence peptidique codée par l'exon 4b (Elachouri et al. 2011) (Figure 14). Grâce à cette interaction, OPA1 contrôlerait la réplication de l'ADNmt et la distribution des nucléoïdes sous la membrane interne mitochondriale.

#### *II. 1. 2. 4. OPA1 et métabolisme énergétique mitochondrial*

Etant donné la localisation d'OPA1 à la membrane interne, des liens directs ou indirects peuvent être supposés avec la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette piste a été étudiée dans des MEFs où la perte d'OPA1 est liée à une diminution sévère de la respiration cellulaire et une baisse de la respiration conduite par les complexes I, III et V (Chen et al. 2005a). De même, la perte de la protéine OPA1 dans les cellules Bêta du pancréas provoque une diminution de l'activité du complexe IV menant à un défaut de la production d'ATP (Zhang et al. 2011). Les perturbations observées de la chaîne respiratoire peuvent être expliquées en partie par une interaction directe montrée entre OPA1 et certains complexes de la chaîne. Les travaux de Zanna et al. publiés en 2008 et réalisés sur des fibroblastes humains, ont montré des interactions par co-immunoprécipitation entre OPA1 et NDUF9 (sous-unité du complexe I), une sous-unité de 70kDa du complexe II (flavoprotéine) et Core 2 (sous-unité du complexe III) (Zanna et al. 2008).

Récemment, une étude a montré que la protéine ROMO1 (Reactive Oxygen Species Modulateur 1) interagit avec les formes courtes et longues d'OPA1, qui a été montrée par des expériences de co-immunoprécipitation. Cette nouvelle protéine est localisée dans la membrane interne mitochondriale et semble être essentielle dans la gestion des stimuli de stress oxydatifs et dans la production d'EAO (Chung et al. 2006; Norton et al. 2014). Ainsi, lors d'un stress oxydant, ROMO1 forme un complexe de haut poids moléculaire et induit l'oligomérisation d'OPA1, ce qui permet de maintenir l'intégrité des crêtes et de la morphologie mitochondriale ce qui rend les cellules résistantes à l'apoptose.

## II. 2. ADOA-1, une rétinopathie génétique rare

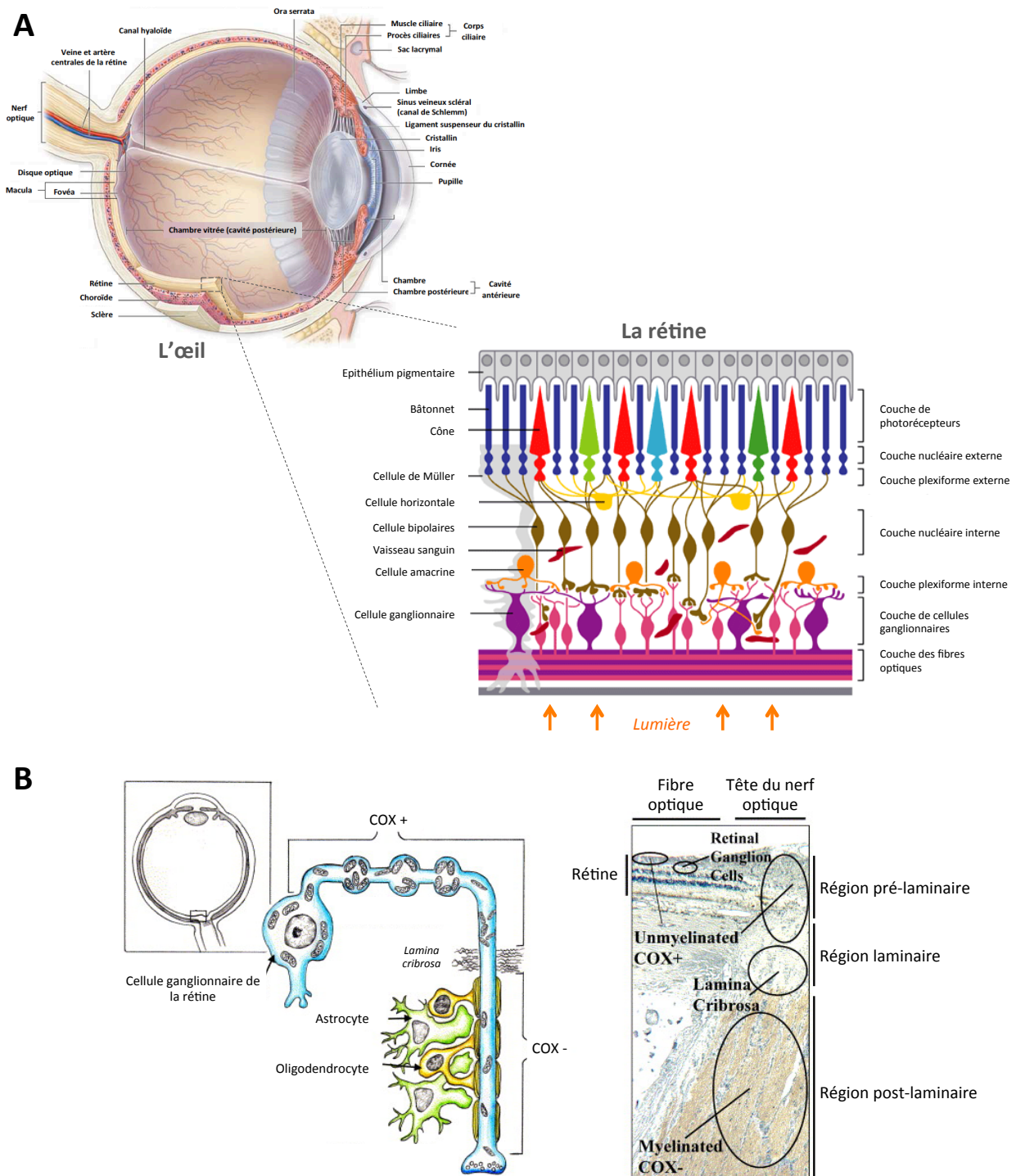
L'ADOA-1 est une maladie dégénérative caractérisée par la perte progressive des cellules ganglionnaires de la rétine.

La rétine est constituée d'un feuillet externe, l'épithélium pigmentaire et d'un feuillet interne, la rétine neuro-sensorielle ou neurale. La rétine neurale est la partie de l'œil responsable de la transformation du signal photonique en signal électrophysiologique/électrique. Elle est constituée de divers types cellulaires, dont les corps cellulaires se répartissent en trois couches : 1) la couche nucléaire externe constituée des photorécepteurs (cônes et bâtonnets), 2) la couche nucléaire interne constituée de cellules bipolaires, amacrines et horizontales) et 3) la couche des cellules ganglionnaires. Les neurones établissent des synapses entre eux au niveau de la couche plexiforme externe (synapses entre la couche nucléaire externe et la couche nucléaire interne) et la couche plexiforme interne (synapses entre la couche nucléaire interne et la couche des cellules ganglionnaires). Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) forment le nerf optique (Figure 15). Ce dernier présente une portion non myélinisée, riche en mitochondries pour fournir l'énergie nécessaire à la transmission de l'influx nerveux (Carelli et al. 2004), et une partie myélinisée, où la conduction de l'influx nerveux devient saltatoire, et contenant moins de mitochondries (Figure 15).

La dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, observée chez les patients atteints d'ADOA-1, entraîne donc une perte des axones qui forment le nerf optique et par conséquent une atrophie du nerf optique, visible grâce à une analyse du fond de l'œil. L'ADOA-1 ou atrophie optique de Kjer (Kjer 1959), est la forme la plus fréquente d'atrophie optique héréditaire avec une prévalence allant de 1/10 000 au Danemark à 1/50 000 dans la population générale.

### II. 2. 1. Tableaux cliniques de la pathologie

Le principal signe de la maladie est une atrophie optique, généralement symétrique, visible sous forme d'une pâleur temporale de la papille optique (Hoyt 1980; Votruba et al. 1998) (Figure 16) révélatrice de la perte des fibres axonales provenant des cellules ganglionnaires de la rétine centrale (macula). L'atrophie s'accompagne d'une perte de la vision centrale caractérisée par une diminution progressive de l'acuité visuelle qui est le plus souvent modérée (6/10 à 2/10) mais qui peut aussi conduire à une cécité légale (<1/20), une amputation du champ visuel central (scotome central) et une dyschromatopsie dans l'axe bleu/jaune appelée tritanopie (perturbation de la vision des couleurs). La survenue de la maladie est qualifiée d'insidieuse du fait de l'imprécision de l'âge de début. Elle est généralement découverte pendant l'enfance, vers l'âge de 4 à 6 ans, mais peut être



**Figure 15 – L'œil, la rétine, les cellules ganglionnaires et le nerf optique**

(A) Représentation schématique de l'œil et d'une coupe de rétine, avec les différentes couches et les cellules associées. (B) Schéma d'une cellule ganglionnaire de la rétine et coupe sagittale immuno-histologique transversale d'un œil humain montrant la rétine et le nerf optique, et les zones myélinisées (myelinated) et non myélinisées (unmyelinated). COX : cytochrome c oxydase (complexe IV). COX + : zone riche en mitochondries, COX - : zone pauvre en mitochondries. Lamina Cribrosa : zone riche en collagène.

Sources : (A) d'après the McGraw Hill Companies, Inc ; Wilinon-Berka JL., 2004, (B) Carelli V. et al., 2004.

diagnostiquée, en fonction du niveau de perte d'acuité visuelle, plus tôt chez le nourrisson sévèrement atteint présentant un nystagmus (Kline and Glaser 1979) ou chez l'adulte lorsque la perte est légère. L'atteinte de très jeunes patients suggère que la maladie est congénitale mais une aggravation avec l'âge est également décrite (Brown et al. 1997). L'ADOA-1 présente une pénétrance incomplète et une expressivité intra et interfamiliale très variable, pouvant aller de porteurs asymptomatiques à la cécité. Les facteurs environnementaux et le fond génétique des personnes interviennent donc de différentes façons dans la mise en place de ces différents symptômes.

Depuis la caractérisation de la maladie en 1959, des études réalisées sur 7 familles atteintes d'ADOA-1, dans les laboratoires de Newcastle, Bologne, Madrid, Montpellier et Angers, ont montré une forme syndromique de la pathologie associée à des atteintes multi-systémiques sévères (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008; Zeviani 2008). Cette forme syndromique a été nommée « ADOA-1 plus ». En effet, en plus des défauts de la vision observés chez les patients dès l'enfance, 15 % d'entre eux développent des atteintes extra-oculaires dont la principale est la surdité (Lenaers et al. 2012). D'autres atteintes peuvent survenir plus tard dans la vie du patient telles qu'une ophtalmoplégie progressive externe, une ataxie, une neuropathie sensitivo-motrice et une myopathie (Lenaers et al. 2012). Tous les patients analysés présentent des délétions multiples de l'ADN mitochondrial dans des biopsies de muscles squelettiques, témoignant du rôle d'OPA1 dans la maintenance du génome mitochondrial. Toutefois, dans certains cas, une perte de l'ADNmt a également été observée chez des patients qui présentent une forme non-syndromique de l'ADOA-1 (Kim et al. 2005). La plupart des atteintes multi-systémiques observées ségrégent avec les mutations retrouvées dans le domaine GTPase de OPA1, comme p.R445H dans l'exon 14 ou p.S545R au niveau de l'exon 17 (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008; Zeviani 2008).

## **II. 2. 2. Profils génétiques des mutations d'OPA1**

Depuis l'identification du gène *OPA1* en 2000 (Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000a), plus de 200 mutations pathogènes ont été rapportées (Ferré et al. 2009) (*mitodyn.org*), réparties sur toute la séquence codante mais touchant majoritairement le domaine GTPase. Ainsi, 37 % des mutations sont localisées dans le domaine GTPase, 33 % dans le domaine dynamine, 18 % dans le domaine GED (GTPase effector domain) et 7 % dans la séquence d'adressage mitochondriale. Certaines génèrent un codon stop précoce conduisant à une protéine tronquée, comme la mutation c.2708\_2711delTTAG située dans l'exon 27 responsable de 30 % des cas d'ADOA-1 (Pesch et al. 2001; Schimpf et al. 2006; Zanna et al. 2008). On retrouve 27 % de mutations faux-sens, localisées dans le domaine catalytique GTPase et susceptibles d'exercer un effet dominant négatif (Amati-Bonneau et al. 2008; Amati-Bonneau et al. 2009; Ferraris et al. 2008; Hudson et al. 2008; Yu-Wai-Man et al. 2011).

	Tableaux cliniques de l'ADOA-1	Souris B6;C3-Opa1 <sup>Q285STOP</sup>	Age	Souris B6;C3-Opa1 <sup>329-355del</sup>	Age	Souris Opa1 <sup>delITAG</sup>	Age
Fonctions visuelles	Acuité visuelle 6/6 à cécité (Kjer et al., 1996)  Atrophie optique avec pâleur du disque optique (Votruba et al., 1998)  Diminution de l'amplitude des potentiels évoqués visuels (Holder et al., 1998)	Diminution des fonctions visuelles (Davies et al., 2007)	6, 12	Diminution de l'amplitude des potentiels évoqués visuels 20-24  Pas de changement significatif dans l'ERG quelque soit l'âge (Heiduschka et al., 2009)	2, 9, 24	Pas de changement significatif dans l'ERG quelque soit l'âge (Sarzi et al., 2012)	5, 9, 11, 16
Phénotypes « Plus »	Surdité neurosensorielle, ataxie, polyneuropathie, ophtalmoplégie externe progressive, myopathie mitochondriale avec COX négative et des RRF (Yu-Wai-Man et al., 2009)	Diminution de l'activité locomotrice (Davies et al., 2007)  Pas de COX-SDH RRF (Yu-Wai-Man et al., 2009)	6	Reflexes moteurs anormaux et tremblements et diminution de l'activité locomotrice 22  Masse corporelle et masse grasse plus faible que les souris sauvages 21  Pas de COX-SDH RRF (Alavi et al., 2009) 21		Surdité  Diminution de l'activité locomotrice  Défauts de COX  Encéphalopathie Neuropathie périphérique Cardiomyopathie (Sarzi et al., 2012)	5, 11
CGR	Perte des CGR (Kjer et al., 1983 ; Johnston et al., 1979)	Pas de différence de population et atrophie dendritique avec l'âge limité à la sublamina b (Williams et al., 2010)	<10, 10-15, >20	Réduction du nombre de CGR avec l'âge, en commençant par la périphérie de la rétine (Heiduschka et al., 2009)	13, 17, 20	Diminution du nombre de CGR (Sarzi et al., 2012)	9, 16
Nerf optique	Démyélinisation (Kjer et al., 1983 ; Johnston et al., 1979)	Démyélinisation, agglutination de la myéline, mais pas de dégénérescence axonale (Davies et al., 2007 ; White et al., 2009)	6, 9, 18, 24	Démyélinisation, désorganisation et morphologie anormale des axones, perte des axones (large et petits) (Alavi et al., 2007)	8	Dégénérescence axonale sévère et démyélinisation prématurée (Sarzi et al., 2012)	5, 11

**Figure 16 – Les données actuelles sur les souris modèles de l'ADOA-1**

Tableau récapitulatif des données phénotypiques des souris modèles de la pathologie de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1). Les âges des souris (en mois) notés en rouge indiquent que le phénotype est plus sévère à cet âge.



Bien qu'aucune corrélation génotype-phénotype n'ait pu être clairement établie dans les études cliniques à grande échelle (Cohn et al. 2007; Pesch et al. 2001; Puomila et al. 2005), il existe une corrélation forte entre la mutation p.R445H et une forme syndromique de l'ADOA-1 associée à la surdité. De plus, une corrélation entre des mutations faux-sens du domaine GTPase, responsables principalement d'un phénomène de dominance négativité, et le phénotype « ADOA plus » a été également décrite.

## II. 3. Implication de la protéine OPA1 dans d'autres pathologies

Etant donné le rôle important de la protéine OPA1 dans la morphologie et le fonctionnement mitochondrial, des dérégulations de cette protéine pourraient intervenir dans d'autres pathologies.

### II. 3. 1. OPA1 et LHON

Comme l'ADOA-1, la pathologie de Leber (LHON) s'accompagne d'une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine. La majorité des mutations responsables de cette maladie touchent des gènes codant des protéines mitochondriales, et notamment ceux qui codent des sous-unités du complexe I (comme ND1, ND4 et ND6). En 2009, une étude a été réalisée chez 4 patients atteints de LHON et montre une diminution de la quantité de protéine OPA1 (Abu-Amero et al. 2010). Ainsi, cette étude propose pour la première fois l'implication d'OPA1 dans la pathogenèse de la maladie de Leber. Toutefois, une autre étude, réalisée un an plus tard sur une plus grande cohorte de patients atteints de LHON, montre qu'il n'y a pas de variant pathogène d'OPA1 (Hudson et al. 2010). De même, les polymorphismes nucléotidiques d'OPA1 (rs166850 et rs10451941) ne sont pas ou peu retrouvés chez les patients. Ainsi, aucune association entre les variants génétiques d'OPA1 et l'atteinte visuelle des patients LHON n'a pu être confirmée par cette étude. L'implication d'OPA1 dans la pénétrance incomplète de la maladie de Leber est donc controversée.

### II. 3. 2. Le glaucome

L'analyse de polymorphismes du gène codant OPA1 a été réalisée chez une cohorte de patients atteints de glaucome à angle ouvert, dit « chronique » ou POAG (Primary Open Angle Glaucoma). Cette pathologie touche environ 60 millions de personnes et représente la seconde cause de cécité dans les pays développés (Bunce and Wormald 2006 ; Quigley and Broman 2006). Deux polymorphismes (SNP introniques : IVS8.4c>t et IVS8.32t>c) ont été associés au risque de développer un POAG (Powell et al. 2003; Yu-Wai-Man et al. 2010). Toutefois, les polymorphismes du gène OPA1 peuvent être considérés comme facteurs de risques pour les patients atteints de POAG avec une

tension intraoculaire normale (NTG), et non une hypertension (HTG). Ces données restent controversées car certaines études ne retrouvent pas l'association entre les SNP d'OPA1 et la pathologie de POAG et proposent de refaire ces analyses sur une cohorte plus importante de patients (Liu et al. 2007; Yao et al. 2006). Une autre étude réalisée sur les souris transgéniques modèles de la pathologie du glaucome montre que la surexpression d'OPA1 dans l'œil, par des adénovirus, améliore la survie des cellules ganglionnaires de la rétine à partir de deux mois après le début du traitement (Ju et al. 2010). Ainsi, OPA1 pourrait être une cible potentielle pour ralentir l'apparition des symptômes du glaucome.

### II. 3. 3. OPA1 et cancer

De nombreuses études exposées en introduction, dont celles menées par notre équipe, montrent que la protéine OPA1 est impliquée dans l'apoptose. Ainsi, la diminution d'OPA1 par interférence ARN, dans des cellules humaines issues d'adénocarcinomes (cellules HeLa), induit une sensibilité accrue des cellules à l'apoptose (Olichon et al. 2007). *A contrario*, la surexpression d'OPA1 protège les cellules cancéreuses issues d'adénocarcinomes de poumon de la mort induite par le Cisplatine (Fang et al. 2012).

De récents travaux ont montré que le traitement de cellules issues d'hépatocarcinomes humains (HCC) avec une molécule pro-apoptotique, le Sorafenib, induit une diminution d'environ 40 % de la quantité d'OPA1, le relargage du cytochrome c et la mort des cellules par apoptose. Pour des cellules HHC ayant développé une résistance à l'apoptose, le Sorafenib s'avère inefficace. Or, la diminution de la quantité d'OPA1 par interférence ARN permet de restaurer la sensibilité des cellules à la mort induite par le Sorafenib (Zhao et al. 2013). OPA1 pourrait ainsi être une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des hépatocarcinomes, en complément d'un agent pro-apoptotique.

Enfin, l'aurilide, une autre molécule très étudiée pour son rôle pro-apoptotique dans des cellules cancéreuses (cancer de la prostate ou leucémie) (Han et al. 2006), accélère le clivage d'OPA1, ce qui induit la fragmentation des organites, la désorganisation des crêtes et la mobilisation du cytochrome c (Sato et al. 2011).

## II. 4. Les modèles *in vitro* et animaux de l'ADOA-1

### II. 4. 1. Les modèles *in vitro* : les cellules de patients atteints d'ADOA-1

Les modèles *in vitro* les plus utilisés dans l'étude des dysfonctions d'OPA1 sont des fibroblastes issus de biopsies de peau de patients atteints d'ADOA-1. Le réseau mitochondrial des fibroblastes de patients est normal ou fragmenté (Amati-Bonneau et al. 2009; Olichon et al. 2007; Spinazzi et al. 2008; Zanna et al. 2008). De plus, chez certains patients atteints d'ADOA-1, la fragmentation des mitochondries est associée à des défauts de distribution de l'organite dans des myotubes (Spinazzi et al. 2008).

La perte de fonction d'OPA1 n'induit pas de déplétion de l'ADNmt dans les cellules issues de patients. Toutefois, le nombre de copies d'ADNmt est diminué dans des lymphocytes, alors que le génome mitochondrial ne semble pas altéré dans des fibroblastes (Kim et al. 2005; Zanna et al. 2008). Néanmoins, des délétions d'ADNmt sont observées dans des cellules musculaires de patients atteints du syndrome « ADOA-1 plus », une forme syndromique de la pathologie qui aboutit à des atteintes extra-oculaires (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008).

La respiration cellulaire est diminuée dans des fibroblastes de patients (Agier et al. 2012; Chevrollier et al. 2008). La production d'ATP, mesurée dans des biopsies de muscle de patients, se trouve diminuée en comparaison avec le groupe contrôle (Lodi et al. 2004). Or ces dérégulations restent controversées car Spinazzi et ses collaborateurs montrent qu'il n'y a pas de différences de production d'ATP et de potentiel de membrane mitochondrial dans des fibroblastes issus de patients, comparativement aux cellules contrôles (Spinazzi et al. 2008). De même, dans des lignées lymphoblastoïdes issues de leucocytes de patients, la respiration mitochondriale reste identique au contrôle (Mayorov et al. 2008) (Figure 17). L'existence et la nature des défauts du métabolisme oxydatif, observé chez certains patients atteints d'ADOA-1, restent encore à élucider.

### II. 4. 2. Les modèles invertébrés

Des mutations du gène *eat-3* chez *Caenorhabditis Elegans*, codant un orthologue de la protéine OPA1, provoquent une fragmentation des mitochondries et une hypersensibilité des vers au stress oxydant (induit par le paraquat) sans augmentation de la mort cellulaire (Kanazawa et al. 2008). Chez la drosophile, la mutation du gène *dOPA1* à l'état homozygote est létale au stade embryonnaire, tout comme chez la souris (Yarosh et al. 2008). Des mutations du gène *dOPA1* à l'état hétérozygote chez la drosophile provoquent : i) une augmentation de la production des espèces actives de l'oxygène, une sensibilité au stress oxydant, ainsi que des défauts dans l'activité des

Modèles	Respiration	$\Delta\Psi$	CI	CII	CIII	CIV	CV	EAOs	ATP	Références
Cellules ou biopsies issues de patients atteints d'ADOA-1										
HeLa (siARN)	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	Olichon A. et al., 2002
HeLa (siARN)	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	Kushnareva YE. Et al., 2012
MEFs (siARN)	↓	↓	↓	-	↓	↓	-	-	-	Chen H. et al., 2005
Muscles	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	Lodi R. et al., 2004
Muscles	=	=	-	-	-	-	-	=	=	Spinazzi M. et al., 2008
Fibroblastes	-	-	-	-	-	↓	↑	-	=	Chevrollier A. et al., 2008
Fibroblastes	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	Zanna C. et al., 2008
Fibroblastes	=	-	-	-	-	↓	-	-	↓	Agier V. et al., 2012
Lymphoblastes	=	-	↓	-	=	=	-	-	-	Mayorov V. et al., 2008
Modèles animaux de l'ADOA-1										
Drosophile	-	-	-	↓	↓	↓	-	↑	-	Tang S. et al., 2009
Poisson zèbre	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	Rahn J. et al., 2013
Souris OPA1 <sup>+/-</sup> (rétine)	-	=	-	-	-	-	-	-	-	Williams PA. Et al., 2012

**Figure 17 – Résumé des données bibliographiques concernant le métabolisme oxydatif dans des modèles cellulaires et animaux de l'ADOA-1 et dans des tissus/cellules issus de patients**

Pour préciser, les cellules notées lymphoblastes sont en réalité des lignées lymphoblastoïdes issues de patients atteints d'ADOA-1. Les fibroblastes ont été mis en culture et sont issus de biopsies de peau de patients. Les muscles sont issus de biopsies de patients et ont été directement analysés.

complexes II, III et IV de la chaîne respiratoire, ii) une morphologie mitochondriale fragmentée dans le cœur et les muscles squelettiques, iii) des dysfonctions de la vision restaurées par des traitements antioxydants et un raccourcissement de la durée de vie des mouches (Shahrestani et al. 2009; Tang et al. 2009) (Figure 17).

### II. 4. 3. Les modèles vertébrés

#### *II. 4. 3. 1. Le poisson zèbre*

Plus récemment, un modèle de poisson zèbre a été développé pour analyser les défauts de développement associés à la perte d'OPA1 (Rahn et al. 2013). Cet animal possède une seule version du gène OPA1, déplété par l'utilisation de morpholinos antisens. Comme attendu, ces mutants présentent des défauts dans la morphologie mitochondriale qui apparaît fragmentée dans les cellules musculaires. Les embryons présentent des défauts du développement tels que : i) des yeux plus petits que le contrôle, ii) une circulation sanguine anormale, iii) des défauts de contraction cardiaque et iv) le ventricule de la partie postérieure du cerveau agrandi. De plus, les individus sont plus courts et présentent des problèmes de locomotion, suggérant un retard de croissance. Enfin, l'activité mitochondriale a été mesurée chez ces animaux au travers de la respiration cellulaire. Les différents états respiratoires (spontané ou maximal) mesurés sont tous plus faibles chez les poissons mutants, quel que soit le nombre d'heures post-fertilisation (24, 48 et 72hpf, *hour post-fertilisation*), exceptée la respiration maximale induite par le FCCP qui est comparable aux contrôles (Figure 17). Les défauts énergétiques mesurés chez les poissons déplétés pour OPA1 pourraient notamment expliquer le retard de croissance observé.

#### *II. 4. 3. 2. La souris B6;C3-*Opa1*<sup>329-355del</sup>*

L'équipe de Wissinger B. a obtenu une souris mutante au niveau d'un site d'épissage (c.1065+5G>A) du gène OPA1, mutation existant chez des patients (Alavi et al. 2007). Cette mutation provoque un saut de l'exon 10 durant l'épissage qui génère une délétion de 27 acides aminés dans le domaine GTPase et mène à l'instabilité de la protéine mutante ne laissant que 50 % de la protéine sauvage. Les souris homozygotes pour cette mutation montrent un retard de développement à E8,5 et les embryons meurent avant d'atteindre le stade embryonnaire E12,5. Les souris hétérozygotes *Opa1*<sup>+/-</sup> sont viables et les axones du nerf optique apparaissent désorganisés et leur nombre diminué, dès la naissance (Alavi et al. 2007). À 8 mois, les souris hétérozygotes *Opa1*<sup>+/-</sup> présentent des mitochondries fragmentées et des crêtes mitochondriales déstructurées dans les axones du nerf optique, qui sont de plus démyélinisés. La perte des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) n'est visible chez les souris qu'à partir du 13<sup>ème</sup> mois et devient massive à 17 mois. Des défauts électro-

physiologiques visualisés par l'étude des potentiels visuels évoqués ne sont détectés chez les souris mutantes qu'à partir de 20 mois. Enfin, à 21 mois, les souris présentent une masse adipeuse plus faible que les souris contrôles et à 22 mois elles ont une diminution de leurs activités locomotrices (Figure 16).

Les capacités cardiaques de la souris *Opa1*<sup>+/-</sup> ont été étudiées par Caffin F. et collègues en 2012 (Piquereau et al. 2012). La diminution de la protéine OPA1 a des conséquences sur la morphologie du réseau mitochondrial dans les cellules cardiaques. La masse mitochondriale n'est pas affectée mais de nombreux amas de mitochondries sont observés dans la cellule et elles présentent une plus grande hétérogénéité de forme et de taille, ainsi que des crêtes altérées. La diminution d'OPA1 a peu de conséquences sur les propriétés oxydatives des mitochondries des cellules cardiaques, que ce soit sur le plan des capacités respiratoires ou sur le couplage entre oxydation et phosphorylation. Enfin, en conditions physiologiques, les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> possèdent une fonction cardiaque identique et une fréquence cardiaque normale. Toutefois, lors d'un stress pathologique, tel que l'induction d'une hypertrophie cardiaque par constriction chirurgicale de l'aorte, les souris mutantes présentent une hypertrophie plus élevée et des altérations plus sévères de la fonction cardiaque.

#### II. 4. 3. 3. La souris B6;C3-*Opa1*<sup>Q285STOP</sup>

Le second modèle d'haploinsuffisance de la pathologie ADOA-1 est une souris transgénique possédant une mutation non sens (Q285X) qui provoque la troncation de la partie de la protéine située au début du domaine GTPase et codée par l'exon 8 (Davies et al. 2007). Comme la précédente, cette mutation entraîne la diminution de moitié de la quantité de la protéine OPA1. Les embryons homozygotes présentent au stade E9,5 un retard de croissance et meurent au stade E13,5. En revanche, les souris hétérozygotes sont viables et fertiles. Les explants de muscles des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> montrent une augmentation des mitochondries fragmentées. La perte des CGR débute tardivement au stade adulte vers 9 mois et atteint son maximum à 24 mois. L'étude de coupes organotypiques de rétine révèle, dès 10 mois, une atrophie de l'arborescence dendritique des CGR de souris hétérozygotes, alors que les effets cliniques ne se déclarent qu'à partir du 12<sup>ème</sup> mois. La dendropathie touche spécifiquement les neurones ON de la sublamina b, qui connectent directement le thalamus, et ne touche pas les neurones OFF de la sublamina a, connectés au cortex. La sublamina b de la couche interne plexiforme fonctionne *via* des synapses glutamatergiques des neurones bipolaires et demande plus d'énergie alors que la sublamina a est également en contact avec les cellules amacrines GABAergiques, qui sont moins demandeuses en énergie et agissent à une différence de potentiel proche de l'équilibre du chlore (Mattson and Magnus 2006). Les axones sont

démyélinisés très tardivement, au 24<sup>ème</sup> mois, toutefois, le nombre d'axones reste constant et comparable aux souris contrôles (Davies et al. 2007; White et al. 2009) (Figure 16).

#### II. 4. 3. 4. La souris *Opa1*<sup>delTTAG</sup>

Récemment, l'équipe de Lenaers G. a généré une nouvelle souris transgénique porteuse de la mutation *OPA1*<sup>delTTAG</sup>, détectée dans environ 30 % des patients atteints d'ADOA-1 (Sarzi et al. 2012). Cette mutation conduit à la délétion des 58 derniers acides aminés sur tous les variants d'OPA1, ce qui entraîne la dégradation de la dynamine et donc un phénomène d'haploinsuffisance. Les embryons homozygotes meurent au stade E10,5. En revanche, les souris hétérozygotes présentent la même espérance de vie que les souris homozygotes sauvages de la même portée. Comme attendu, les mitochondries apparaissent fragmentées dans les fibroblastes et les cellules de Müller (cellules gliales de la rétine) des souris mutantes. Les électrorétinogrammes ne révèlent pas de réels défauts dans les souris mutantes, toutefois elles présentent une dégénérescence axonale et une démyélinisation prématurée de ces axones à partir du 5<sup>ème</sup> mois, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules ganglionnaires de la rétine d'environ 40 % à 9 mois et 50 % à 16 mois. Contrairement au phénotype humain associé à cette mutation, responsable d'une atrophie optique, les souris présentent une forme syndromique de la pathologie dite « ADOA-1 plus » avec des atteintes extra-oculaires. En effet, dès 5 mois les souris commencent à avoir des problèmes d'audition et sont sévèrement sourdes à 11 mois. De même, les souris développent, à partir du 5<sup>ème</sup> mois, des problèmes locomoteurs qui pourraient être le signe d'une neuropathie périphérique ou d'une ataxie. L'activité de la cytochrome c oxydase (COX, complexe IV), mesurée à 5 mois et 11 mois dans la rétine, le nerf optique et les muscles glycolytiques, est diminuée dans les souris mutantes, ce qui témoigne d'un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial. De plus, les souris présentent une encéphalopathie, une neuropathie périphérique et une cardiomyopathie, avec des défauts d'organisation des fibres musculaires (Figure 16).

### III. L'état redox : un équilibre entre Espèces Actives de l'Oxygène et défenses antioxydantes

#### III. 1. Les Espèces Actives de l'Oxygène

##### III. 1. 1. Réactions d'oxydo-réduction et état redox

L'état d'oxydo-réduction (redox) reflète un équilibre dynamique entre l'oxydation et la réduction de molécules dans la cellule. L'oxydation correspond à une perte d'électrons et la réduction à un gain d'électrons. Une molécule est oxydante quand elle a la possibilité de gagner un électron, elle passe alors d'un état oxydé à un état réduit. Une molécule réductrice est capable de céder un électron, elle passe donc d'un état réduit à un état oxydé. Ainsi les réactions redox correspondent à un processus de transfert des électrons. Les deux états, réduit et oxydé, d'une même molécule forment un couple redox avec un potentiel redox qui leur est propre, noté  $E^\circ$ . Un agent réducteur puissant possède un potentiel redox négatif alors qu'un agent oxydant puissant présente un potentiel redox positif. En présence de deux couples redox, le transfert d'électrons est possible dans le sens croissant des  $E^\circ$ .

Le potentiel redox intracellulaire est la résultante de l'état redox (rapport des formes oxydées et réduites d'un couple redox) de couples prépondérants dans la cellule comme le glutathion. L'oxydation de faibles quantités de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) peut changer ce rapport et donc l'état redox général de la cellule. D'autres couples redox tels que les quinones ou la vitamine E conditionnent l'état redox du glutathion lui-même.

##### III. 1. 2. Définition et nature des Espèces Actives de l'Oxygène

Les Espèces Actives de l'Oxygène (EAO) sont des espèces dérivées de l'oxygène sous forme de radicaux libres ou de molécules (Calderon and Roberfroid 1988.; Gomez-Cabrera et al. 2012; Gutteridge 1994; Liu et al. 2014; Venditti et al. 2013) (Figure 18 A). Un radical libre peut être une molécule ou un atome neutre ou chargé, qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe. Cette molécule, généralement instable, est capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules environnantes : en arrachant un électron (réduction) ou en cédant un électron (oxydation). Ces réactions radicalaires conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne. La molécule d'oxygène possède deux électrons non appariés sur sa couche externe et a tendance à



**A**

Symbole	Espèces Actives de l'Oxygène (EAO)
$O_2^{\cdot-}$	Anion superoxyde
$\cdot O_2$	Oxygène singulet
$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène
$\cdot OH$	Radical hydroxyle
$R\cdot$	Radical alkyle
$ROO\cdot$	Peroxyle
$LOO\cdot$	Lipide peroxyde
$NO$	Oxyde nitrique
$ONOO\cdot$	Peroxynitrate
$HOCl$	Acide hypochlorique

**B**

Production des EAO	Molécules impliquées
<b>Cytosol</b>	Xanthine oxydase Lipoxygénase/Cyclooxygénase
<b>Réticulum endoplasmique</b>	Cytochrome P-450 Cycle redox des xénobiotiques
<b>Mitochondrie</b>	Chaine respiratoire mitochondriale Cycle redox des xénobiotiques Monoamine oxydase
<b>Peroxisome</b>	Peroxydase
<b>Phagosome</b>	NAD(P)H oxydase
<b>Membrane plasmique</b>	NAD(P)H oxydase

**Figure 18 – Nature et production des Espèces Actives de l'oxygène (EAO)**

(A) Tableau qui résume les principales Espèces Actives de l'Oxygène présentes dans la cellule. Les espèces dérivées de l'oxyde nitrique (NO) ne sont pas mentionnées ici. (B) Tableau qui indique la localisation intracellulaire et les molécules impliquées dans la production des EAO.

*Pour revue Nickel A. et al., 2014.*

accepter les électrons un par un. Ces réductions mono-électroniques de l'oxygène donnent naissance à différentes EAO dont les principales sont décrites ci-dessous.

**L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )** est le premier radical produit par la réduction mono-électronique de l'oxygène. Cette molécule a une demi-vie très courte. Elle est peu diffusible mais constitue le précurseur d'autres EAO, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).  $O_2^{\cdot-}$  peut également, en compétition avec la réaction de dismutation, oxyder les agrégats Fer-Souffre des déshydratases.

**Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )** est produit, en parallèle de l'oxygène, lors de la dismutation spontanée de l'anion superoxyde avec des protons. Cette molécule est plus stable et diffuse librement dans les milieux aqueux et lipidiques.  $H_2O_2$  n'est pas réellement un radical mais par réduction mono-électronique, il donne naissance à un des radicaux les plus réactifs, le radical hydroxyle.

**Le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ )** peut être produit suite à de nombreuses réactions : i) la scission homolytique de la liaison -O-O- de l' $H_2O_2$  qui donne 2  $\cdot OH$ , ii) la réaction de Fenton induit, en présence d'ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et de peroxyde d'hydrogène, la formation d'ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) et de radical hydroxyle, iii) la réaction d'Haber Weiss qui donne naissance à cette molécule en présence d' $O_2^{\cdot-}$  et d' $H_2O_2$  et enfin, iv) ce radical peut être généré par la réaction du monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) et de  $O_2^{\cdot-}$  dans certains types cellulaire (cellules endothéliales, neurones, macrophages). Le radical hydroxyle a une très grande réactivité et oxyde pratiquement toutes les molécules avoisinantes comme les acides nucléiques, les protéines, les acides gras polyinsaturés et les glucides.

**Les radicaux alkyles ( $R\cdot$ ) et peroxydes ( $ROO\cdot$ )** sont générés par l'action oxydante du radical hydroxyle sur les acides gras polyinsaturés. Ces réactions en chaînes sont donc responsables de la peroxydation lipidique.

**L'oxyde nitrique (NO)** est synthétisé à partir de la L-arginine et de l'oxygène par les NO synthases (NOS) dans la plupart des cellules de mammifères. Cette famille d'enzymes comprend les isoformes nNOS (neuronal NOS ou NOS1), iNOS (inducible NOS ou NOS2) et eNOS (endothelial NOS ou NOS3). En plus de ces trois isoformes cytoplasmiques, les cellules de mammifères expriment une isoforme mtNOS (mitochondrial NOS) au niveau de la mitochondrie.

### III. 2. Origines des EAO dans la cellule

Les origines des EAO sont résumées dans le tableau B de la figure 18.

### III. 2. 1. La mitochondrie

La mitochondrie est le site majeur de production cellulaire des EAO. En effet, dans les cellules non phagocytaires, elle représente le siège de 80 % de la production intracellulaire d'EAO totaux (Turrens 2003). Une faible proportion, 2 à 6 %, de l'oxygène n'est pas totalement transformé en molécules d'eau par la mitochondrie, donnant lieu à une réduction mono-électronique de l'O<sub>2</sub> en anion superoxyde (Dröge 2002; Gomez-Cabrera et al. 2012; Turrens 1997; Turrens 2003).

#### *III. 2. 1. 1. Site de production des EAO*

Les sites principaux responsables de la production mitochondriale des EAO sont **les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire**. La part respective de chacun des complexes dépendrait du type cellulaire, des substrats disponibles et des conditions expérimentales (Popa-Wagner et al. 2013; Ray et al. 2012). Le complexe I, qui contrôle majoritairement la respiration et la production d'ATP dans le cerveau, est considéré comme un site majeur de la production des EAO dans ce tissu (Davey et al. 1998; Robinson et al. 1998; Schapira 1998). Cette production se fait majoritairement lors du transport reverse des électrons, du succinate (complexe II) vers le NAD<sup>+</sup> (complexe I) (Liu et al. 2002; Selivanov et al. 2011; Turrens and Boveris 1980; Votyakova and Reynolds 2001). La production de l'anion superoxyde au niveau du complexe I serait due i) à l'addition directe d'un électron à l'oxygène par l'un des 7 centres Fe-S qui composent ce complexe, ou ii) de manière indirecte lors de la réduction des semiquinones. Le groupement prosthétique FMN (Flavine MonoNucléotide) serait également capable de générer l'anion superoxyde (Liu et al. 2002).

Le complexe III est responsable de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par l'intermédiaire du coenzyme Q sous sa forme ubisemiquinone, comme il a été montré lors d'analyses réalisées dans le tissu cardiaque de rat (Turrens et al. 1985).

Certains travaux ont récemment révélé que des EAO pouvaient également être générées à partir du complexe II. C'est le cas chez les plantes (Gleason et al. 2011) ou lors de la formation de tumeurs de manière contrôlée par le facteur HIF-1alpha (Guzy et al. 2005).

#### *III. 2. 1. 2. Modulation de la production des EAO mitochondriales*

La production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les complexes I, II et III est un processus non enzymatique, contrôlé par la loi d'action de masse. Elle dépend de la concentration en oxygène et de l'état de réduction des transporteurs de la chaîne respiratoire. La concentration en oxygène a un effet direct sur la production de radicaux libres. Une hyperoxie (à partir de 60 % d'oxygène) induit une augmentation de la quantité de ces molécules réactives (Turrens et al. 1985; Turrens et al. 1982). En suivant la loi

d'action de masse, lors d'une hypoxie (1 à 5 % d'oxygène), la production d'EAO devrait être diminuée. Or, de façon surprenante, de nombreuses études montrent une augmentation de la production d'EAO par la mitochondrie (principalement le complexe III) (Guzy et al. 2005; Li et al. 2012; Schroedl et al. 2002). Toutefois, en anoxie (0 à 0,5 %), la production d'EAO diminue (Schroedl et al. 2002). De nombreuses hypothèses ont été soulevées, comme par exemple l'implication d'une signalisation faisant intervenir le monoxyde d'azote (NO) (Cooper and Davies 2000). En hypoxie, le NO inhiberait le complexe IV ce qui augmenterait l'état de réduction des complexes en amont et donc la production d'anion superoxyde.

Lors d'un apport excessif de substrats par rapport aux réels besoins énergétiques de la cellule (rapport ATP/ADP élevé), l'arrivée massive d'électrons sans dissipation du potentiel de membrane par l'ATP synthase peut être à l'origine d'une surproduction d'EAO. Ainsi, l'hyperglycémie augmente la production d'EAO (Nishikawa et al. 2000).

Des molécules endogènes ou des agents pharmacologiques comme la roténone (inhibiteur du complexe I), le malonate (inhibiteur du complexe II), l'antimycine ou le céramide (inhibiteur du complexe III), le monoxyde d'azote ou le cyanure (inhibiteurs du complexe IV), ou l'oligomycine (inhibiteur du complexe V), sont utilisés pour augmenter la production d'EAO (García-Ruiz et al. 1997; Kumar et al. 2013; Moncada and Bolaños 2006; Papa et al. 2000; Xiong et al. 2012). Ces agents permettent de mimer un stress oxydant et d'étudier les effets de ce processus délétère sur la cellule. À l'inverse, diminuer de façon modérée le potentiel de membrane permet de diminuer la production d' $O_2^-$  : c'est la théorie du mild uncoupling (Shabalina and Nedergaard 2011; Skulachev 1996). En effet, lors d'un découplage modéré entre le fonctionnement de la chaîne respiratoire et celui de l'ATP synthétase, les transporteurs d'électrons sont dans un état plutôt oxydé et la production d' $O_2^-$  est faible. Les protéines découplantes UCP (UnCoupling Protein), insérées dans la membrane interne mitochondriale, permettent de faire transiter les protons de l'espace intermembranaire à la matrice, sans générer de l'ATP, et sont ainsi capables de moduler la production d'EAO (Nègre-Salvayre et al. 1997). Ainsi, les animaux génétiquement invalidés pour le gène UCP3 présentent des signes de stress oxydant notables (Vidal-Puig 2000). De même, des agents pharmacologiques, comme le FCCP (Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine) ou le CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine), activent la chaîne respiratoire jusqu'à son maximum, entraînent une chute du potentiel de membrane mitochondrial et une diminution des EAO. Cependant, ces molécules, entraînant un découplage sévère, peuvent induire des phénomènes de mitophagie pour éliminer les mitochondries endommagées (Feng et al. 2013; Narendra et al. 2008; Otera et al. 2013; Perkins et al. 2009).

### III. 2. 2. Les sources non mitochondriales

**Les NADP(H) oxydases**, ou NOX, sont des enzymes membranaires qui produisent l'anion superoxyde à partir de deux molécules d'oxygène et d'un équivalent réduit, le NADPH. Des isoformes phagocytaires qui interviennent dans les processus d'inflammation font l'objet d'une abondante littérature (Kleikers et al. 2012; Kobayashi et al. 2001; Lambeth and Neish 2014; Paclet et al. 2007; Sedeek et al. 2013). La NADPH oxydase neuronale contribue à la signalisation neuronale, à la mise en place de processus mnésiques ainsi qu'à la formation des neurites induite par le facteur de croissance NGF (Brennan et al. 2009; Ibi et al. 2006; Tejada-Simon et al. 2005). Certaines isoformes ont été impliquées dans les maladies neurodégénératives.

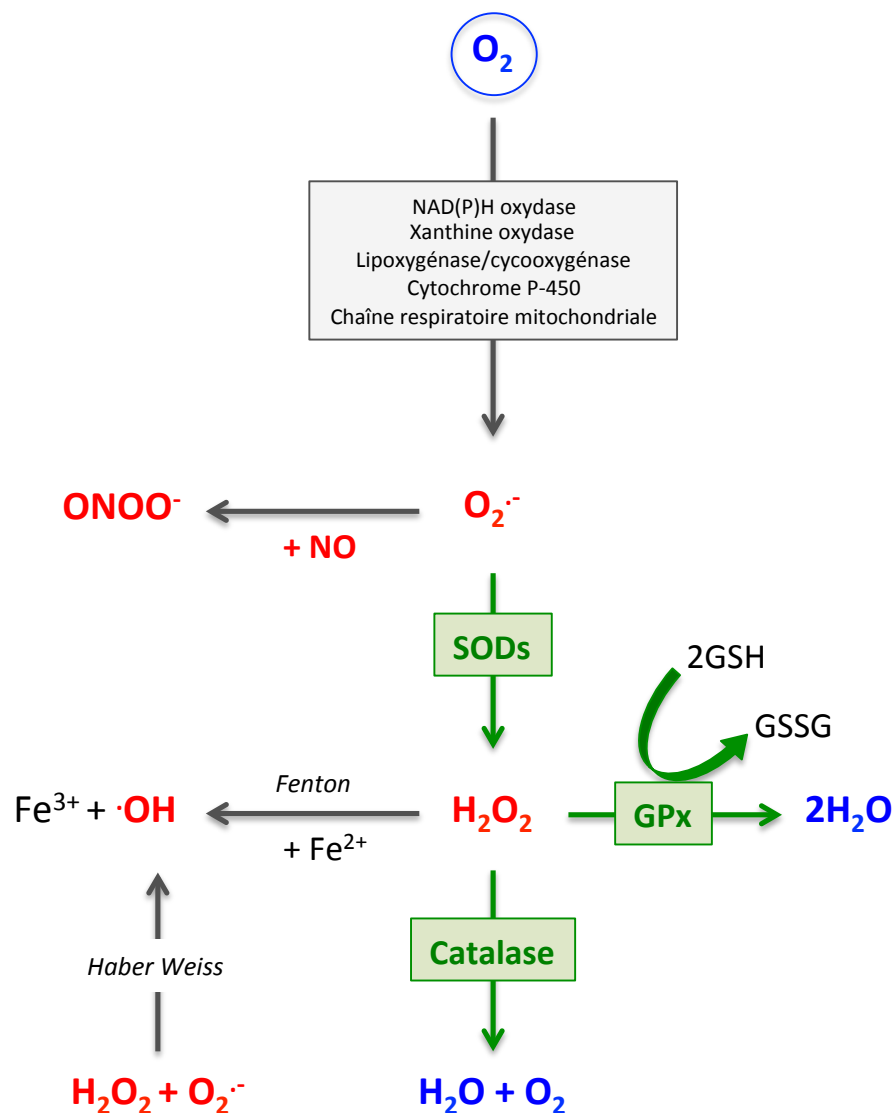
**Les cytochromes P-450 monooxygénases** sont localisées dans le réticulum endoplasmique et participent à la détoxification de molécules xénobiotiques (pesticides, polluants, anesthésiques). Les substrats difficilement oxydables par le cytochrome P-450 entraînent la production d'anion superoxyde (Martiny and Miteva 2013; Renault et al. 2014).

**Les oxydases** produisent, à partir de l'oxygène moléculaire, l'anion superoxyde lors de réactions cataboliques. Les oxydases se situent principalement dans les péroxysomes (péroxydases), dans le cytosol (xantine oxydase) et à la membrane externe des mitochondries (monoamines oxydases). Ces dernières sont impliquées dans le catabolisme des monoamines (dopamine, noradrénaline, sérotonine, ...) (Bansal and Kanwar 2013; Cantu-Medellin and Kelley 2013).

**La lipoxygénase et la cyclooxygénase** qui synthétisent les eïcosanoïdes (leucotriènes, prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes) à partir de l'acide arachidonique, produisent également des EAO tels que le radical hydroxyle ou des ROO<sup>•</sup> (Kawamura et al. 2014; Krieg and Fürstenberger 2014).

### III. 3. Les défenses antioxydantes : systèmes de gestion directe des EAO

Afin d'éviter de basculer dans un état de stress oxydant, la cellule est dotée d'un système de gestion des EAO qui limite leur concentration. Il existe différents antioxydants de nature variable, qui agissent soit en inhibant la formation des EAO, soit en les piégeant, en les métabolisant ou encore en réparant les dommages oxydatifs occasionnés.



**Figure 19 – Système de détoxification directe des EAO par les enzymes antioxydantes**

Ce schéma résume les réactions enzymatiques qui aboutissent à la détoxification complète des Espèces Actives de l'Oxygène (EAO) (notées en rouge). Les 3 enzymes principales (notées en vert) sont les superoxydes dismutases (SOD1, 2 et 3), la catalase et la glutathion peroxydase (GPX). Cette dernière fait intervenir le glutathion sous sa forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG), le principal piègeur d'EAO de la cellule. En parallèle, plusieurs réactions moléculaires peuvent avoir lieu à partir de dérivés oxygénés, comme la réaction de Fenton et d'Haber Weiss qui aboutissent à la production du radical hydroxyle, le plus réactif et donc le plus délétère pour la cellule. D'autres réactions à partir de radicaux oxygénés et de l'oxyde nitrique (NO) aboutissent à de nombreuses espèces nitrosées dont le peroxynitrate ( $ONOO^{\cdot}$ ).

### III. 3. 1. Les enzymes

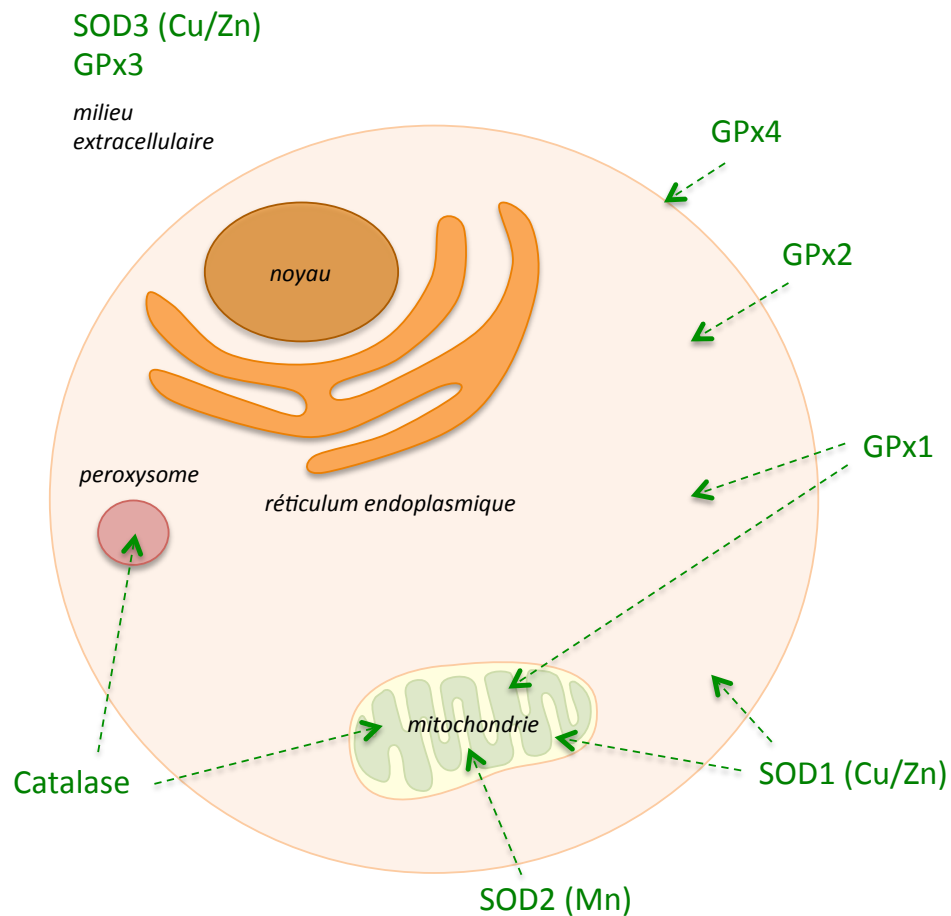
Plusieurs enzymes dégradent directement les EAO (Liochev 2013; Matés and Sánchez Jiménez 1999; Tokarz et al. 2013) (Figures 19 et 20).

**Les superoxydes dismutases (SOD)** (Huang et al. 2012; McCord and Fridovich 1969a, McCord and Fridovich 1969b; Milani et al. 2013), assurent la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et oxygène ( $O_2$ ). Trois isoformes de la SOD sont présentes chez l'homme : SOD1 et SOD3 (dépendantes des ions cuivre/zinc) et SOD2 (dépendante des ions manganèse). La SOD3 est extracellulaire : elle est présente dans les espaces interstitiels et les fluides extracellulaires tels que le plasma sanguin et la lymphe (Matés and Sánchez-Jiménez 1999; Qi et al. 2004). La SOD2 est localisée uniquement dans la matrice mitochondriale. La SOD1 est présente dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire des mitochondries. L'action des SOD peut être couplée à celle d'enzymes décomposant le peroxyde d'hydrogène : la catalase et les glutathion peroxydases (Figures 19 et 20).

**La catalase** est une enzyme héminique, qui décompose  $H_2O_2$  en eau et en oxygène. Son activité est inhibée en présence d'une concentration en  $H_2O_2$  supérieure à 100  $\mu M$ . Elle est présente dans les peroxysomes et dans les mitochondries (Figures 19 et 20) (Sies 2014).

**Les glutathion peroxydases (GPx)**, enzymes à sélénium, décomposent  $H_2O_2$  en eau et en oxygène, et les hydroperoxydes ( $ROOH$ ) en eau et alcool, en présence de glutathion réduit (GSH). La GPx1, présente dans le cytosol et la matrice mitochondriale, joue un rôle majeur dans la plupart des tissus. La GPx2, cytoplasmique, a une expression tissulaire très faible, mis à part dans le tractus gastro-intestinal. L'isoforme GPx3 est essentiellement présente dans le plasma. Enfin, l'isoforme GPx4, appelée aussi hydroxyperoxyde glutathion peroxydase, exerce son action spécifiquement au niveau des membranes cellulaires, en réduisant les hydroperoxydes du cholestérol et des phospholipides présents dans les membranes (Figures 19 et 20) (Matés and Sánchez-Jiménez 1999; Srikanth et al. 2013; Tokarz et al. 2013).

L'importance de ces enzymes antioxydantes dans la gestion des EAO est clairement mise en évidence par le phénotype des animaux transgéniques invalidés pour les gènes correspondants. Ainsi, les souris invalidées pour le gène SOD2 (*Sod2*<sup>-/-</sup>) présentent une létalité néonatale associée à une cardiomyopathie, une accumulation massive de lipides dans le foie et des diminutions drastiques de l'activité d'enzymes mitochondriales contenant des agrégats Fe-S (aconitase, succinate et NADH déshydrogénases) (Li et al. 1995). Une étude sur des souris hétérozygotes *Sod2*<sup>+/-</sup> âgées de 3 mois, montre des signes de dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial, une altération du rendement



**Figure 20 – Localisation intra- et extracellulaire des enzymes antioxydantes**

Les principales enzymes antioxydantes sont les superoxydes dismutases (SODs), la catalase et les glutathions peroxydases (GPx). Il existe 3 isoformes de SODs localisées dans différents compartiments : SOD1 (cytosol et espace intermembranaire mitochondrial), SOD2 (matrice mitochondriale) et SOD3 (extracellulaire). GPx est présent sous 4 isoformes : GPx1 (cytosol et matrice), GPx2 (cytosol), GPx3 (extracellulaire) et GPx4 (membrane plasmique). La catalase est présente dans deux compartiments : les peroxysomes et la mitochondrie.



bioénergétique et de la respiration mitochondriale. L'augmentation de l'apoptose conduirait à la senescence tissulaire et au vieillissement prématuré de ces souris (Kokoszka et al. 2001). Les souris inactivées pour le gène codant la catalase ont un développement normal mais présentent toutefois des signes de sensibilité au stress oxydant (Ho et al. 2004). De même, les souris déficientes pour le gène codant la GPx1 (GPx1<sup>-/-</sup>) sont viables. Une augmentation des hydroperoxydes lipidiques dans le foie est observée chez ces souris et les mitochondries du foie produisent 4 fois plus d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que les mitochondries des animaux contrôles (Esposito et al. 2000; De Haan et al. 2004). De plus, ces souris présentent une diminution de 20 % du poids corporel s'expliquant probablement par un retard de croissance dû au stress oxydant.

### III. 3. 2. Les molécules « piègeurs »

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques de la cellule sont le plus souvent lipophiles (vitamine E, coenzyme Q ou ubiquinone et caroténoïdes) ou hydrophiles (vitamine C, glutathion). Sous leur forme réduite respective, ces molécules sont capables de piéger de manière plus ou moins efficace, les radicaux libres (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>OH et ROO<sup>•</sup>). Ces molécules peuvent provenir de l'alimentation comme les vitamines C et E ou les caroténoïdes et peuvent également être synthétisées par l'organisme (glutathion, coenzyme Q) (Ashor et al. 2014; Bolhassani et al. 2014; Brandmeyer et al. 2014; Carvalho et al. 2014; Rizvi et al. 2014).

**Le coenzyme Q**, localisé dans les membranes biologiques, agit comme piègeur d'EAO sous sa forme réduite, et comme transporteur d'électrons pour la chaîne respiratoire où il constitue une source essentielle d'anion superoxyde.

**L'acide  $\alpha$ -lipoïque**, molécule amphiphile et coenzyme nécessaire à l'activité de différentes enzymes (complexe pyruvate décarboxylase), est aussi un excellent piègeur de la plupart des EAO (Packer et al. 1995).

**Le glutathion** est un tripeptide (glutamate, cystéine, glycine) présent dans toutes les cellules eucaryotes. Le rôle antioxydant du glutathion est lié à la présence d'un groupement thiol –SH sur le glutathion réduit (GSH). Le couple GSH/GSSG est le principal couple redox des cellules eucaryotes et protège les cellules des dommages oxydatifs induits par les EAO. Il est le maillon essentiel de la régulation de la présence de ponts disulfure (-S-S-) sur les chaînes peptidiques. Le GSH est le cofacteur spécifique des GPx, qui ont pour rôle de réduire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les ROOH en eau et ROH respectivement (Figure 19). Le GSH est lui-même piègeur de radicaux libres tels que les radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>OH et ROO<sup>•</sup>. La régénération du GSH à partir du GSSG est réalisée par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH, H<sup>+</sup>. Le stockage cellulaire du glutathion se fait pour 90 % dans le cytosol et

10 % dans la mitochondrie qui ne peut le synthétiser.

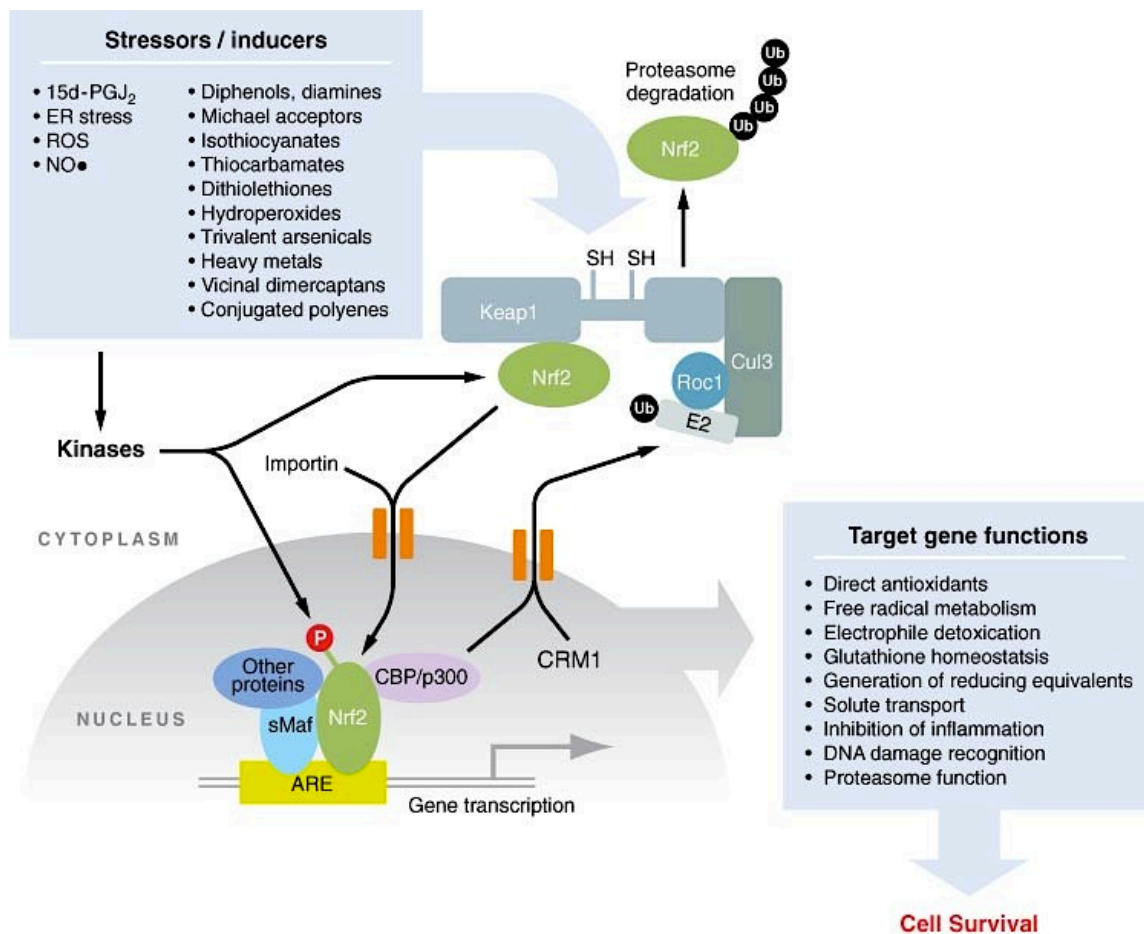
Comme le glutathion, **la thioredoxine** est capable de réduire les résidus cystéines oxydés par les EAO et est (ré)générée en permanence par la thioredoxine reductase (Conrad et al. 2013; Lopert et al. 2012).

### III. 4. La voie de signalisation du facteur de transcription NRF2

La détoxification des EAO peut passer par l'utilisation de molécules « ARE (Antioxidant Responsive Element) inducers » qui activent la translocation de facteurs de transcription impliqués dans l'activation de l'expression d'enzymes de détoxification, présentant la séquence ARE au niveau de la région promotrice du gène (Hu et al. 2010). NRF2 (Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2) est un facteur de transcription capable d'activer ces gènes, ce qui représente une des principales voies de détoxification de la cellule. Cette protéine orchestre la signalisation des EAO à la fois dans les conditions physiologiques et pathologiques. Outre l'homme, la souris et le rat, des orthologues de NRF2 ont été identifiés chez le nématode (Tullet et al. 2008), la drosophile (Sykiotis and Bohmann 2010), et le poisson (M. Kobayashi et al. 2002).

NRF2 est un facteur de transcription appartenant à une famille comprenant NRF1, NRF2 et NRF3 (Sykiotis and Bohmann 2010). NRF2 a un rôle majeur dans le contrôle de la détoxification des xénobiotiques électrophiles, d'oxydants et de molécules chimiques pro-oxydantes. Ce rôle physiologique confère aujourd'hui à ce régulateur une importance grandissante chez l'homme dans la protection contre des stress environnementaux et vis-à-vis de la carcinogenèse chimique et des pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques.

Lorsque la cellule est dans un état réduit, Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) est associé au cytosquelette d'actine, interagit avec NRF2 et le séquestre dans le cytosol (K Itoh et al. 1999; Kang et al. 2004; Kensler, Wakabayashi, and Biswal 2007) (Figure 21). De plus, Keap1, qui est un adaptateur d'un complexe E3 ligase dépendant de la culline 3 (Cul3), permet l'ubiquitinylation de NRF2 et sa dégradation par le protéasome (Cullinan and Diehl 2004; Furukawa et al. 1993; Ken Itoh et al. 2003; Kang et al. 2004; McMahon et al. 2003; Stewart et al. 2003; Zhang and Hannink 2003; Zhang et al. 2004). En présence d'inducteurs (endogènes ou exogènes) (Figures 21 et 22), Keap1 est oxydé sur ses résidus cystéines, ce qui induit la dissociation du complexe Keap1/NRF2. NRF2 n'est alors plus ubiquitinylé, sa demi-vie augmente significativement et il s'accumule dans le noyau des cellules *via* un transport actif grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) (Jain et al. 2005).



**Figure 21 – Signalisation du facteur de transcription NRF2**

Des inducteurs exogènes ou endogènes, tels que les EAOs, induisent une dissociation de NRF2 d'avec Keap1, ce qui empêche l'ubiquitination de NRF2 et donc sa dégradation par le protéasome. Après une phosphorylation de NRF2 par une série de kinases, le facteur de transcription est transloqué au noyau pour se lier aux séquences ARE, en s'associant avec d'autres facteurs de transcription comme les Mafs. Cette association forme un complexe transcriptionnel qui permet la transcription de gènes cibles comme les gènes antioxydants. La voie de NRF2 constitue une réponse adaptative qui améliore la résistance des cellules aux stress environnementaux ou endogènes.

Source : Kensler TW. et al., 2007.

L'activité de NRF2 est également contrôlée par phosphorylation. La phosphorylation de NRF2 au niveau de la tyrosine 568 par la kinase Fyn, induit l'export de la protéine par le récepteur d'export nucléaire Xpo1/Crm1, et par conséquent son inactivation (Jain et al. 2005; Salazar et al. 2006). NRF2 est également un substrat direct de la kinase PERK, une des kinases contrôlant la réponse de stress de surcharge du réticulum, ou UPR (Unfolded Protein Response), ayant pour effet d'empêcher l'interaction de NRF2 avec Keap1 et d'augmenter la synthèse de glutathion réduit (GSH) (Cullinan and Diehl 2004; Cullinan et al. 2004). Le monoxyde de carbone active aussi NRF2 d'une façon dépendante de PERK, bien qu'il n'induisse pas de stress UPR (Kim et al. 2007). La protéine kinase C (PKC) semble également avoir un rôle important dans la régulation de NRF2. Elle phosphoryle la protéine au niveau de la sérine 40, à proximité des sites d'ubiquitinylation, induisant ainsi une perte d'interaction avec Keap1 (Bloom and Jaiswal 2003; Huang et al. 2002). De même, des enzymes de la famille des MAPKs (Mitogen-Associated Protein Kinases), permettent la régulation de gènes présentant la séquence ARE comme ERK et JNK qui sont des régulateurs positifs de la voie NRF2 et p38MAPK, un régulateur négatif (Keum 2012). Les sites de phosphorylation ne sont pas encore décrits pour ces kinases.

Une fois dans le noyau, NRF2 s'associe sous forme d'hétérodimère avec l'un des trois membres de la famille des protéines Maf (MafF, MafG, ou MafK) (Kobayashi and Yamamoto 2006) (Figure 21). Ce complexe se lie spécifiquement à un site de reconnaissance à l'ADN appelé ARE pour « Antioxidant Responsive Element » ou encore EpRE pour « Electrophile Response Element », présents dans les régions régulatrices de ses gènes cibles. NRF2 reste le facteur de transcription majeur dans l'activation des gènes qui présentent les séquences ARE (Itoh et al. 1997).

Le répertoire de gènes régulés par le facteur de transcription NRF2 a été révélé par l'utilisation de puces à ARN (microarray) (Kobayashi and Yamamoto 2006). Plus de 200 gènes ont été répertoriés comme cibles de NRF2 et codent entre autre des enzymes antioxydantes (SOD1, SOD2, catalase, peroxyredoxine), des enzymes du métabolisme du glutathion (glutathion reductase,  $\gamma$ -glutamyl-cystéine ligase), des enzymes impliquées dans le métabolisme des thiols (thioredoxine reductase 1, thioredoxine 1), des enzymes de phase II (NQO1 « NADPH:quinone oxydoréductase 1 », GST « glutathion S-transférase », UGT « UDP-glucuronyl transférase ») et des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (Hème oxygénase I, Ferritine chaîne lourde et chaîne légère) (Prester et al. 1995; Thimmulappa et al. 2002).

INDUCTEURS ENDOGENES	INDUCTEURS EXOGENES	
	Inducteurs d'origine naturelle (alimentation)	Inducteurs synthétiques
EAOs (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NO...)	Sulforaphane	D3T (3H-1,2-Dithiole-3-thione)
15-déoxy-Δ <sup>12,14</sup> -Prostaglandin J <sub>2</sub>	α-Lipoic acid	CPDT (5,6-Dihydrocyclopenta[c][1,2]-dithiole-3(4H)-thione)
Aldéhydes	Curcumin	Oltipraz
Acides gras nitrosés	Nordihydroguaiaretic acid	Salicylcurcuminoid
Dopamine	DAS (diallyl sulfide)	BG12
Œstrogène	DADS (diallyl disulfide)	Bardoxolonemethyl
Hydroperoxydes	DATS (diallyl trisulfide)	
	Resveratrol	
	Pterostilbene	
	β-Carotene	

**Figure 22 – Les molécules inductrices de NRF2 connues à ce jour**

Le tableau résume les inducteurs endogènes et exogènes connus à ce jour induisant une activation du facteur de transcription NRF2.

*Pour revue Keum YS. et al., 2012.*

### III. 5. Les effets délétères des EAO

#### III. 5. 1. Le stress oxydant

L'équilibre redox peut être rompu par une production excessive d'EAO (stress endogène ou exogène) ou par une diminution des capacités antioxydantes de la cellule, incapables de tamponner cet excès de radicaux libres : c'est le stress oxydant (Federico et al. 2012; Finkel 2001; Sohal and Orr 2012; Y. Zhao and Zhao 2013).

Le stress oxydant est caractérisé par un niveau élevé des EAO qui persiste dans le temps. Les modifications des molécules environnantes sont, cette fois-ci, irréversibles et non spécifiques (Dröge 2002). Les protéines sont sujettes à une oxydation massive de divers acides aminés, principalement au niveau des groupements sulfhydryles (-SH) de la cystéine, ce qui conduit à la formation des ponts disulfures. Des modifications irréversibles et non spécifiques provoquent aussi la dégradation des acides gras polyinsaturés (péroxydation lipidique) (Roberts and Morrow 2000). Des dommages à l'ADN par l'oxydation des bases azotées, principalement au niveau de la guanine qui une fois oxydée donne la 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG), sont également rencontrés (Valavanidis et al. 2009).

#### III. 5. 2. EAO et maladies neurodégénératives

Bien que de nombreuses études aient révélé le rôle central des dérégulations de l'homéostasie redox dans la genèse de pathologies, nous ne donnerons que des exemples associés aux maladies neurodégénératives et au vieillissement en général.

Les EAO sont liées à la genèse de nombreuses pathologies et leur implication dans les maladies neurodégénératives est notamment abondamment décrite dans la littérature (Dexter et al. 1994; Valko et al. 2007). En effet, des marqueurs de stress oxydatif intracellulaires ont été observés dans des cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson (MP), de la maladie d'Alzheimer (MA), de la Chorée de Huntington (MH) ou encore de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ces marqueurs sont notamment issus de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines (carbonylation) (Markesbery and Lovell n.d.; Smith et al. 1998; Valko et al. 2007) ainsi que d'altérations au niveau de l'ADN et de l'ARN (marqueur 8-OHdG) (Alam et al. 1997; Guzy et al. 2005; Pilger and Rüdiger 2006; Valavanidis et al. 2009).

Grâce aux nombreux modèles murins qui existent aujourd'hui, les pistes de compréhension de la pathogenèse des maladies neurodégénératives sont très étudiées et notamment celle de l'implication des EAO dans la mort neuronale (Navarro-Yepes et al. 2014). Pour donner quelques

exemples, l'analyse du statut redox à l'aide de sondes comme roGFP montre que les souris APP/PS1, modèles de la maladie d'Alzheimer, ont un potentiel redox élevé et un stress oxydatif localisé au niveau des neurites, à proximité des plaques amyloïdes (Xie et al. 2013). Un autre modèle de la MA montre des altérations profondes des complexes I à IV de la chaîne respiratoire mitochondriale associées à une augmentation du taux d'anion superoxyde intra-mitochondrial et du taux d'EAO dans le cytosol (Rhein et al. 2009). De même, les souris *Parkin*<sup>-/-</sup>, modèles de la maladie de Parkinson, présentent une diminution de la respiration mitochondriale et du taux de protéines antioxydantes (Palacino et al. 2004). Enfin, on observe une augmentation de radicaux libres dans la moelle épinière de souris mutantes SOD1<sup>G93A</sup>, modèles de la SLA, qui s'accompagne de la dégénérescence des motoneurones (Liu et al. 1998; Vehviläinen et al. 2014).

### III. 5. 3. La théorie radicalaire du vieillissement

#### *III. 5. 3. 1. Le vieillissement*

Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques et d'une susceptibilité plus élevée de développer différentes maladies (Bossy-Wetzel et al. 2003; Liochev 2013; Mattson and Magnus 2006; Venditti et al. 2013; Venkataraman et al. 2013). La théorie radicalaire explique ces altérations par l'accumulation de molécules oxydées et leurs conséquences comme l'apparition de mutations dans l'ADN mitochondrial et nucléaire, ainsi que par la carbonylation des protéines, leur dénaturation et leur agrégation, aux côtés de l'oxydation des lipides. Il y aurait une corrélation inverse entre la durée de vie et les dommages oxydatifs. Cette théorie a été formulée pour la première fois par Harman, en 1956, avant même que la pertinence biologique des radicaux libres ait été démontrée (Harman 1956). Plusieurs arguments mettent en avant l'implication des radicaux libres dans les mécanismes du vieillissement. Une élévation des marqueurs biologiques du stress oxydant comme la 8-oxo-guanine, le dialdéhyde malonique (MDA) et les isoprostanes a été observée au cours du vieillissement de nombreuses espèces (Lane 2003). Par ailleurs, des études récentes de la variation du transcriptome au cours du vieillissement, y compris chez le singe, ont révélé l'induction de plusieurs gènes codant des enzymes antioxydantes et la répression de gènes de la chaîne respiratoire, révélatrices d'une adaptation au cours du temps à un état cellulaire pro-oxydant (Kayo et al. 2001). Enfin, l'efficacité des mécanismes de réparation cellulaire comme le protéasome, les protéines chaperones, plusieurs enzymes réductrices et les systèmes de réparation de l'ADN diminue avec l'âge, ce qui contribue à l'accumulation d'anomalies dans la cellule (Kirkwood and Shanley 2005; Kirkwood 2005; Sohal and Orr 2012; Sohal 2002a, Sohal 2002b). Les cellules se comportent comme si elles avaient un « capital anti-stress » dont l'épuisement conduit au vieillissement. Ainsi, toute condition environnementale ou génétique

tendant vers l'augmentation des agressions cellulaires (oxydantes ou non) ou vers des diminutions des capacités de défenses ou de réparation, devrait se traduire par un vieillissement accéléré.

### *III. 5. 3. 2. Le vieillissement cellulaire ou sénescence*

Au niveau cellulaire, le vieillissement est dénommé sénescence, un état irréversible dans lequel les cellules endommagées ne prolifèrent plus, mais demeurent métaboliquement actives (Ben-Porath and Weinberg 2005; Bischof et al. 2009). La sénescence est un processus moléculaire complexe activé par différents stimuli. Dans les conditions physiologiques, les mitoses successives induisent la sénescence dite répllicative. Elle est provoquée par le raccourcissement des télomères, inhérent à la division cellulaire et reconnu comme un dommage à l'ADN. Ce raccourcissement active les protéines inhibitrices du cycle cellulaire comme p21<sup>cip1/waf1</sup>, p53, p16 et Rb (protéine du rétinoblastome) et mène finalement à la sénescence par épuisement du potentiel réplcatif (Brown et al. 1997; Takai et al. 2003). Toutefois, la sénescence peut aussi être déclenchée indépendamment de la longueur des télomères, en présence de diverses sources de stress comme des oncogènes, rayons UV ou le stress oxydant. On parle alors de sénescence induite prématurément par le stress (SIPS). Elle passe par la cavéoline-1, la voie de ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases 1 and 2) et celle de p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) qui activent également les protéines inhibitrices du cycle cellulaire (Ben-Porath and Weinberg 2005; Bischof et al. 2009).

### *III. 5. 3. 3. Sénescence, EAO et mitochondries*

L'origine de l'accumulation d'EAO dans la cellule induite lors du vieillissement est principalement mitochondriale (Sastre et al. 2003; Viña et al. 2003). En effet, la mitochondrie est non seulement une des principales sources d'EAO intracellulaires, mais aussi la cible directe de leurs conséquences délétères. Les fonctions, la morphologie et le renouvellement des mitochondries sont altérés au cours du vieillissement, notamment en raison de l'accumulation de mutations somatiques de l'ADN mitochondrial, une cible privilégiée des EAO produites par la chaîne respiratoire. Comme exemple, le nématode *C. Elegans* muté pour *mev-1*, déficient pour le complexe II de la chaîne respiratoire, présente des dommages oxydatifs et une diminution de 30 % de sa durée de vie. Ces vers subissent donc un vieillissement accéléré et le traitement par des composés mimétiques des activités SOD ou catalase (EUK-8 et EUK-134) restaure une durée de vie égale à celle des vers sauvages (Melov 2000; Melov et al. 2000), démontrant un fois de plus le rôle fondamental des EAO mitochondriales dans le processus du vieillissement. Chez l'homme, l'augmentation des dommages oxydatifs au cours de l'hyperglycémie et du vieillissement, mais aussi au cours de certaines maladies mitochondriales (syndromes MELAS [Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke



like episodes] et MERRF [Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibres]) ou neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), pourrait être liée à une surproduction d'EAO mitochondriales non compensées.

# Problématique

---

# PROBLEMATIQUE

---

L'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) est, avec la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), la forme majoritaire d'atrophie optique héréditaire. Cette rétinopathie est caractérisée par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine se traduisant par une atrophie du nerf optique et pouvant conduire dans certains cas à la cécité. Des mutations du gène codant la protéine mitochondriale OPA1 sont responsables de la mise en place de la pathologie de l'ADOA-1. Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques responsables de la pathogenèse de l'ADOA-1, l'équipe s'est intéressée dans un premier temps aux effets de la perte de fonction d'OPA1 *in vitro*. La diminution de la protéine OPA1 (par stratégie d'interférence à l'ARN) dans des cellules HeLa et des cellules NIH-OVCAR-3, induit notamment une sensibilité accrue des cellules à l'apoptose (Olichon et al. 2007). De même, cette sensibilité aux stimuli pro-apoptotiques a été retrouvée dans des fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1 et dans des cellules HeLa exprimant différentes formes pathogènes du gène *OPA1*, et ce quels que soient la mutation et les mécanismes engendrés (haploinsuffisance ou « dominance négativité ») (Olichon et al. 2003). Ainsi, les neurones ganglionnaires de rétine de patients atteints d'ADOA-1 pourraient dégénérer par apoptose, comme cela a été proposé pour la neuropathie optique de Leber (Carelli et al. 2004).

L'ADOA-1 présente une pénétrance incomplète et une variation des atteintes inter- et intra-familiales qui la placent dans les maladies monogéniques à caractère multifactoriel (Lenaers et al. 2012). Environ 20 % des patients présentent une forme syndromique de la maladie avec des atteintes neuronales extra-oculaires comme une surdité, une ataxie et/ou une myopathie (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008). De nombreuses études se sont focalisées sur le rôle de la protéine dans la fusion des membranes internes mitochondriales ou dans son rôle anti-apoptotique par la séquestration du cytochrome c dans l'espace intra-crête (Olichon et al. 2006). Une autre piste a été explorée à partir de modèles invertébrés de l'ADOA-1 (*Drosophila* ou *C. Elegans*), de cellules invalidées pour OPA1 ou de tissus de patients, supposant l'implication de la dynamine dans le métabolisme énergétique mitochondrial (Kanazawa et al. 2008; Tang et al. 2009). Néanmoins, certains des résultats obtenus restent controversés et les mécanismes moléculaires sont mal identifiés.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'étiologie de la maladie de l'ADOA-1, nous avons donc choisi de déterminer l'interactome d'OPA1 à partir de neurones corticaux pour préciser les partenaires clés de la dynamine. Nous avons dans ce contexte identifié un acteur

central du métabolisme oxydatif mitochondrial. Ainsi, une partie importante de mon projet de thèse s'est inscrite dans un objectif global visant à caractériser l'homéostasie redox des cellules, consécutivement à la perte de fonction de la dynamine mitochondriale OPA1. Nous avons principalement travaillé sur différents modèles cellulaires de l'ADOA-1, tels que la lignée cellulaire HeLa et des neurones corticaux de rats en culture primaire, invalidés pour OPA1 par une stratégie d'interférence à l'ARN, et des fibroblastes de peau de patients. Certaines questions ont également pu être posées dans un modèle murin de la pathologie. Nous avons donc exploré plus précisément les répercussions de la perte de fonction de la dynamine sur le métabolisme oxydatif mitochondrial, sur l'état des défenses antioxydantes et sur les mécanismes intracellulaires impliqués lors d'un stress oxydatif.

# Résultats

# RESULTATS

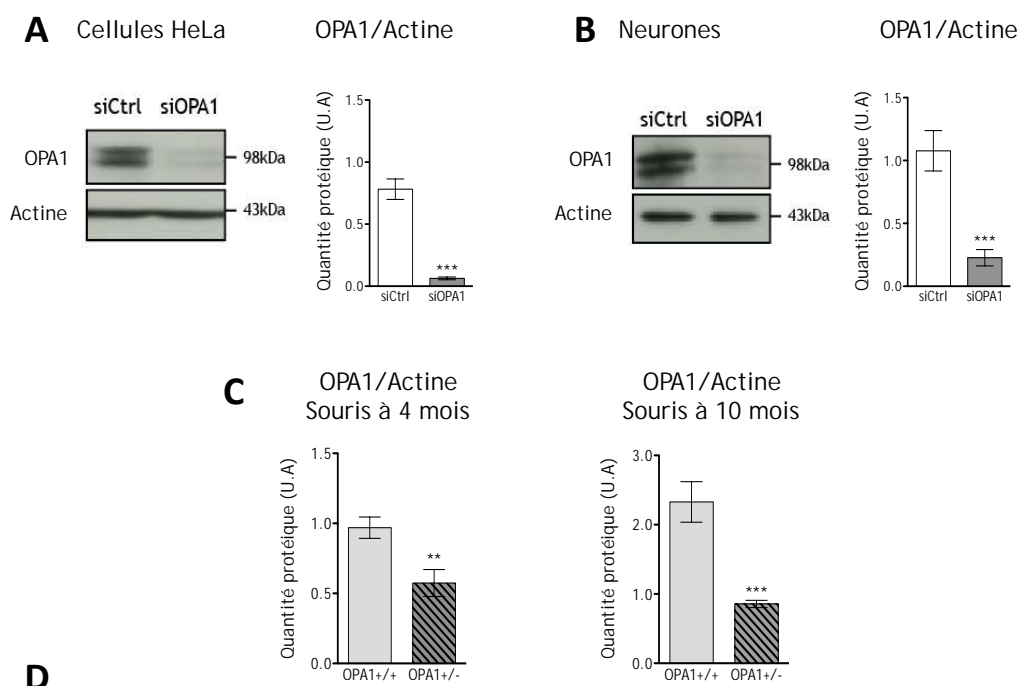
---

## I. Effets de la diminution d'OPA1 sur l'homéostasie redox et conséquences sur la pathogenèse de l'ADOA-1

### I. 1. Contexte et objectifs

Comme préalablement mentionné, l'expression de mutants pathogènes d'OPA1 sensibilise les cellules à l'apoptose (Olichon et al. 2007). Comme proposé pour la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), l'apoptose pourrait être un mécanisme de mort impliqué dans la pathologie de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) (Valerio Carelli et al. 2004). Un des mécanismes majeurs impliqués dans la mort cellulaire, notamment dans les pathologies neurodégénératives, est le stress oxydatif induit par un excès EAO (Federico et al. 2012; Yan et al. 2013; Yen et al. 2006). Un stress oxydant endogène a souvent pour origine des dérégulations du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, une des hypothèses formulées quant au rôle de la protéine mitochondriale OPA1 dans la pathogenèse de l'ADOA-1 est son implication dans le métabolisme oxydatif mitochondrial. Rappelons que, en effet, dans des modèles cellulaires ou animaux de l'ADOA-1, la respiration est diminuée et les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont altérées (Agier et al. 2012; Chen et al. 2005a; Chevrollier et al. 2008; Kanazawa et al. 2008; Lodi et al. 2004; Tang et al. 2009). Toutefois, ces résultats sont controversés par certaines études indiquant qu'il n'y a pas de perturbation des fonctions oxydatives mitochondriales dans certaines cellules de patients atteints d'ADOA-1 (Mayorov et al. 2008; Spinazzi et al. 2008).

Pour clarifier ce point, nous avons choisi de modéliser *in vitro* un mécanisme d'haploinsuffisance d'OPA1 avec une stratégie d'interférence ARN, dans des cellules HeLa et des neurones en culture primaire. Nous avons caractérisé l'état du métabolisme oxydatif de ces cellules dans lesquelles l'expression d'OPA1 est diminuée. Sachant que des dérégulations de la chaîne respiratoire peuvent aboutir à une production excessive d'EAO, nous avons également analysé la réponse antioxydante dans ces modèles. Puis, nous avons complété nos investigations en utilisant un modèle murin de la pathologie et des fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1.



Volontaires sains	Age (ans)	Genre	-	-	-	-
C1	43	M	-	-	-	-
C2	28	M	-	-	-	-
C3	25	F	-	-	-	-
C4	new born	M	-	-	-	-
C5	-	-	-	-	-	-
Patients ADOA-1	Age (ans)	Genre	Mutations du gène	Mutations des protéines	Localisation	Caractéristiques cliniques
P1	20	M	c.1770 G<C	splicing defect p?	Exon 18	ADOA-1
P2	11	F	c.1334_G<A	p.R445H	Exon 14	ADOA-1 'plus' et surdité
P3	16	F	c.1146_A<G	p.I382M	Exon 12	ADOA-1 et surdité
P4	51	F	c.2708_2711del	p.(Val903Glyfs*3)	Exon 27	ADOA-1
P5	30	F	c.1334_G<A	p.R445H	Exon 14	ADOA-1 'plus' et surdité
P6	44	M	c.1937_C<T	p.S646L	Exon 20	ADOA-1 et sclérose
P7	10	M	c.1146_A<G	p.I382M	Exon 12	ADOA-1 et ataxie
P8	35	M	c.1635_C<G	p.S545R	Exon 17	ADOA-1 'plus' et ataxie

### Figure 1 – Les modèles cellulaires et animaux de la pathologie de l'ADOA-1

Immunoblots et histogrammes représentatifs de la quantité d'OPA1, relative à l'actine, dans des cellules HeLa (A) (n=8) et des neurones (B) (n=5), traités par siOPA1 (gris) ou siCtrl (blanc). (C) Histogrammes représentatifs de la quantité d'OPA1, relative à l'actine, déterminée par immunoblot après une extraction protéique de cortex de souris sauvages (OPA1+/+) ou mutées (OPA1+/-) pour la dynamine, âgées de 4 (n=10) et 10 mois (n=6). T-test de Student non-apparié,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . (D) Tableau récapitulatif des 5 volontaires sains (contrôles, C1 à C5) et des 8 patients atteints d'ADOA-1 (P1 à P8), avec leur âge, leur genre, les mutations du gène et des protéines associées, la localisation des mutations et les caractéristiques cliniques des individus. U.A : Unité Arbitraire.

## I. 2. Modèles expérimentaux et méthodologie

### I. 2. 1. Les cellules HeLa

Nous avons choisi d'utiliser les cellules HeLa comme modèle car celui-ci a permis de caractériser la plupart des fonctions attribuées à OPA1. Toutes les analyses présentées ont été réalisées 3 jours après transfection des cellules HeLa par des siARN contrôles (siCtrl) ou ciblant l'ARN messager d'OPA1 (siOPA1). La quantité d'OPA1 est systématiquement diminuée de 80 à 90 % par rapport aux cellules contrôles, ce qui est considéré comme un phénomène d'haploinsuffisance sévère (Figure 1A).

### I. 2. 2. Les neurones en culture primaire

Nous avons également utilisé un modèle de neurones en culture primaire. Les neurones corticaux sont issus d'embryons de rat prélevés au stade E17. Ces cellules sont capables de progresser d'un état immature à un état mature *ex vivo* comme en témoignent la croissance neuritique et la mise en place de synapses (Bertholet et al. 2013; Chang and Reynolds 2006). La viabilité des neurones a été estimée par coloration au Bleu Trypan et reste élevée jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour de culture, atteignant 85 %. Au stade E17, le tissu nerveux prélevé chez les embryons de rats est constitué majoritairement de neurones post-mitotiques (95 %). La faible proportion de cellules gliales (prolifératives) n'est détectée qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour de culture et représente environ 7 % de la population totale. Au cours des douze jours de culture, cette proportion augmente, mais ne dépasse pas 25 %. Enfin, la maturation des neurones a été évaluée : la croissance neuritique et la synaptogenèse ont été analysées par immunocytofluorescence à DIV2, DIV4, DIV6, DIV8, DIV10 et DIV12 (DIV : Days In Vitro). Le réseau dendritique ne cesse de s'étoffer jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour de culture *ex vivo* et les marqueurs synaptiques apparaissent dès DIV4, puis augmentent progressivement jusqu'à DIV12.

Les analyses ont été réalisées dans des neurones invalidés pour la protéine OPA1 par une stratégie d'interférence à l'ARN, au 6<sup>ème</sup> jour de culture car, à ce stade, les neurones sont considérés comme morphologiquement matures, la maturation synaptique n'étant pas achevée. La quantité d'OPA1 est systématiquement diminuée de 60 % par rapport aux cellules contrôles, ce qui modélise un phénomène d'haploinsuffisance (Figure 1B).



### I. 2. 3. Les fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1

Nos collaborateurs Pascal Reynier et Arnaud Chevrollier (CHU d'Angers) nous ont fourni des fibroblastes humains issus de 8 patients atteints d'ADOA-1 (P1 à P8) et de 5 volontaires sains (C1 à C5) (Figure 1D). Les cellules ont été récoltées, cultivées puis analysées à environ 70 % de confluence.

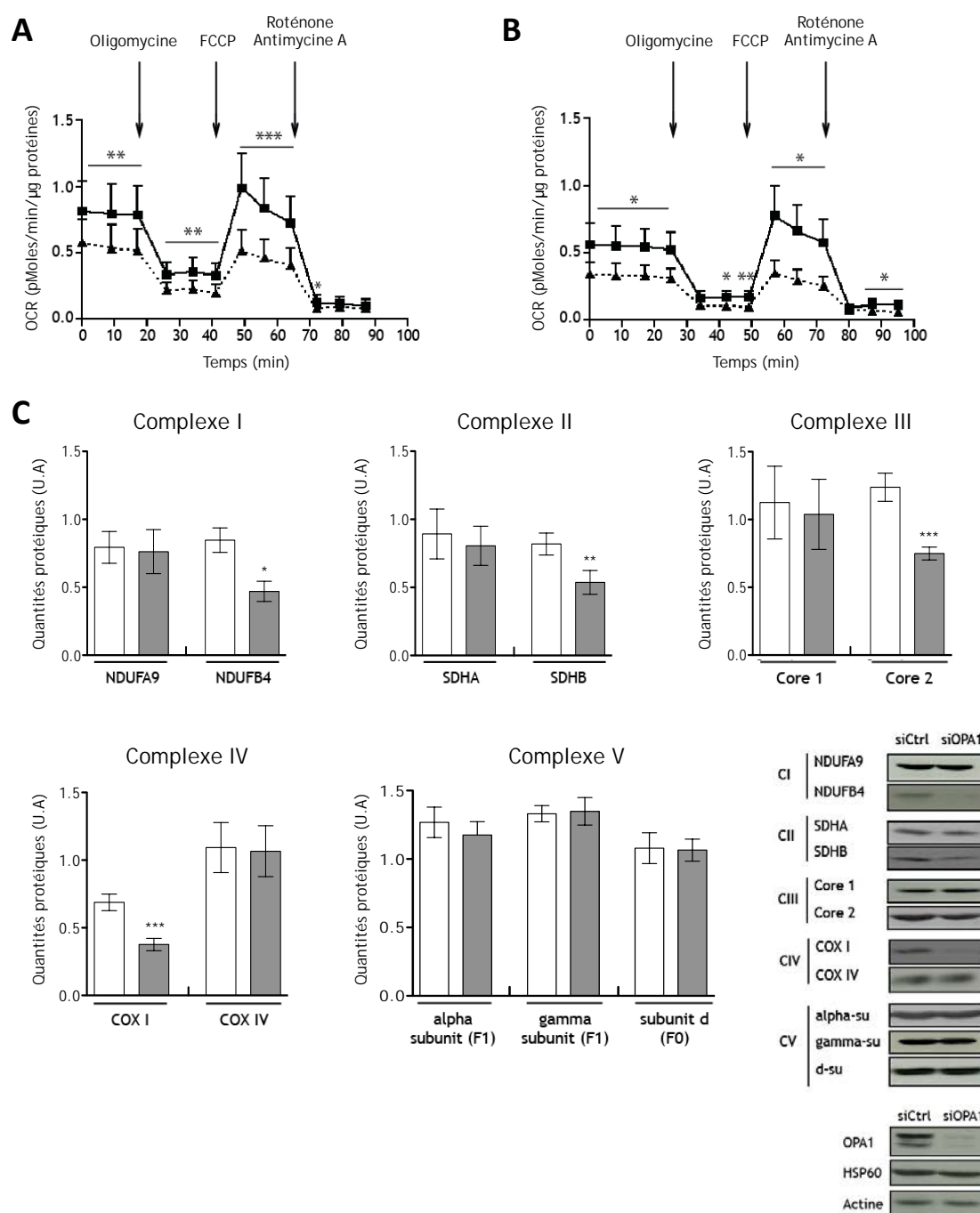
### I. 2. 4. Les souris *OPA1*<sup>+/-</sup>

Les souris hétérozygotes B6;C3-*Opa1*<sup>329-355del</sup> possèdent des mutations au niveau du site d'épissage (c.1065+5G>A) du gène *OPA1*, reproduisant une mutation qui existe chez des patients (Alavi et al. 2007) (Figure C). Les analyses ont été réalisées sur des souris de 4 mois (n=10) (environ 40 % de diminution d'*OPA1*) et 10 mois (n=6) (environ 60 % de diminution d'*OPA1*). Les souris contrôles *OPA1*<sup>+/+</sup> sont issues de la même portée que les hétérozygotes.

## I. 3. Résultats

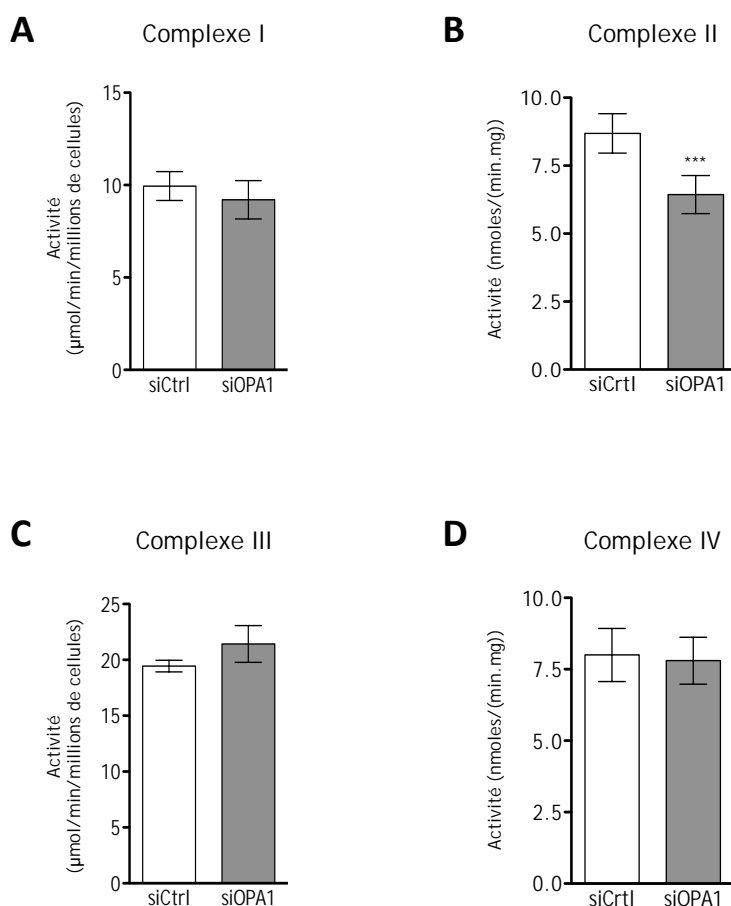
### I. 3. 1. Caractérisation du métabolisme oxydatif dans des cellules déplétées pour *OPA1*, par une stratégie d'interférence à l'ARN

L'équipe a précédemment montré que la diminution d'*OPA1* dans des cellules HeLa induit une chute du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon et al. 2003). Ces données suggèrent une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire consécutive à la perte d'*OPA1*. Après avoir confirmé la diminution du potentiel de membrane dans les neurones (Article Bertholet et al., 2003, partie III des résultats, Figure 7A), nous avons donc mesuré la consommation en oxygène des cellules HeLa et des neurones déplétés pour *OPA1*, à l'aide de la technique Seahorse Biosciences (XF24 Analyser) (Figure 2A et B). Dans les deux modèles, la respiration spontanée des cellules déplétées en *OPA1* est significativement diminuée de 33 (neurones) à 40 % (HeLa) par rapport aux cellules contrôles. De plus, la respiration maximale, en présence de FCCP, est au même niveau que la respiration spontanée, suggérant que la capacité respiratoire de ces cellules est déjà au maximum. Ces défauts de l'activité de la chaîne respiratoire peuvent être corrélés à des diminutions de certaines sous-unités des complexes I, II, III et IV, respectivement de 45 %, 30 %, 40 % et 46 %, que nous avons obtenues dans des cellules HeLa transfectées avec si*OPA1* (Figure 2C), et des complexes I, III et IV dans des neurones (Article Bertholet et al., 2003, partie III des résultats, Figure 7D). De plus, comme certaines sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées par le génome mitochondrial (ADNmt) et que la protéine *OPA1* intervient dans le maintien de l'ADNmt (Elachouri et al, 2011), le nombre de nucléoïdes a été déterminé dans des neurones déplétés ou non pour *OPA1*



**Figure 2 – La diminution d’OPA1 perturbe la quantité et l’activité de la chaîne respiratoire mitochondriale**

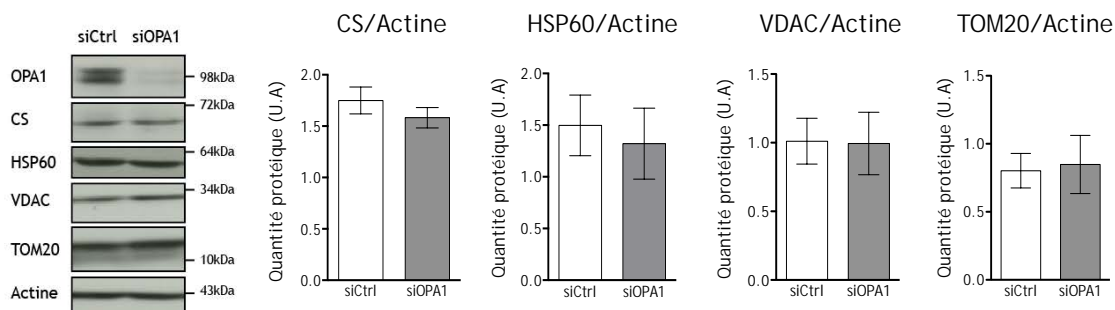
La consommation en oxygène (OCR : oxygen consumption rates) a été mesurée 6 jours après transfection des neurones (A) ou 72h après transfection des cellules HeLa (B) par siOPA1 (ligne en pointillée) ou siCtrl (ligne continue) (n=3). (C) Immunoblots et histogrammes représentatifs de la quantité de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale relative à la protéine mitochondriale HSP60, dans des cellules HeLa invalidées (gris) ou non (blanc) pour OPA1 (n=7-10). T-test de Student apparié,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . U.A : Unité Arbitraire.



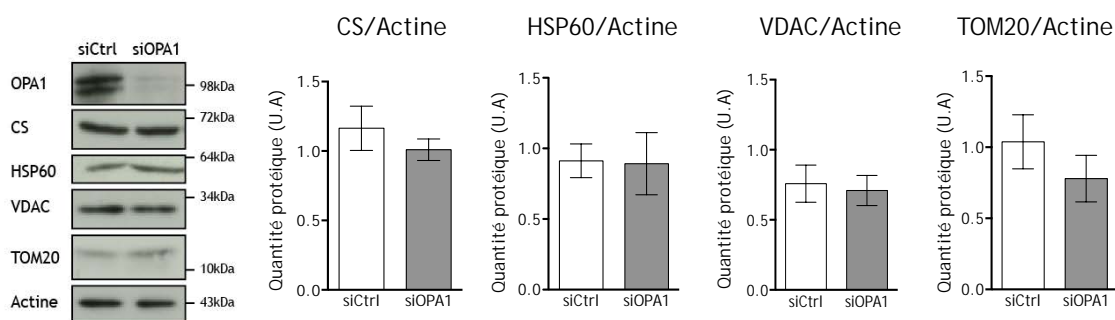
**Figure 3 – Activité *in vitro* des 4 complexes de la chaîne respiratoire**

(A) L'activité du complexe I a été déterminée par la mesure de l'oxydation du NADH à 340nm, au spectrophotomètre (Dr Christine Demeilliers, Grenoble) (n=3). (B) L'activité du complexe II a été mesurée par la réduction du DCPIP (2,6-dichlorophénol-indophénol), un accepteur artificiel d'électrons, à 600nm (Dr Anne Lombès, Paris) (n=16). (C) L'activité du complexe III a été déterminée par la réduction du cytochrome c, qui augmente l'absorbance à 550nm (Dr Christine Demeilliers, Grenoble) (n=3). (D) L'activité du complexe IV a été mesurée par l'oxydation du cytochrome c, qui diminue l'absorbance à 550nm (Dr Anne Lombès, Paris) (n=16). Toutes ces activités ont été déterminées à partir de lysat de cellules HeLa transfectées avec siOPA1 (gris) ou siCtrl (blanc). T-test de Student apparié,  $p < 0,001$ \*\*\*.

## A Cellules HeLa

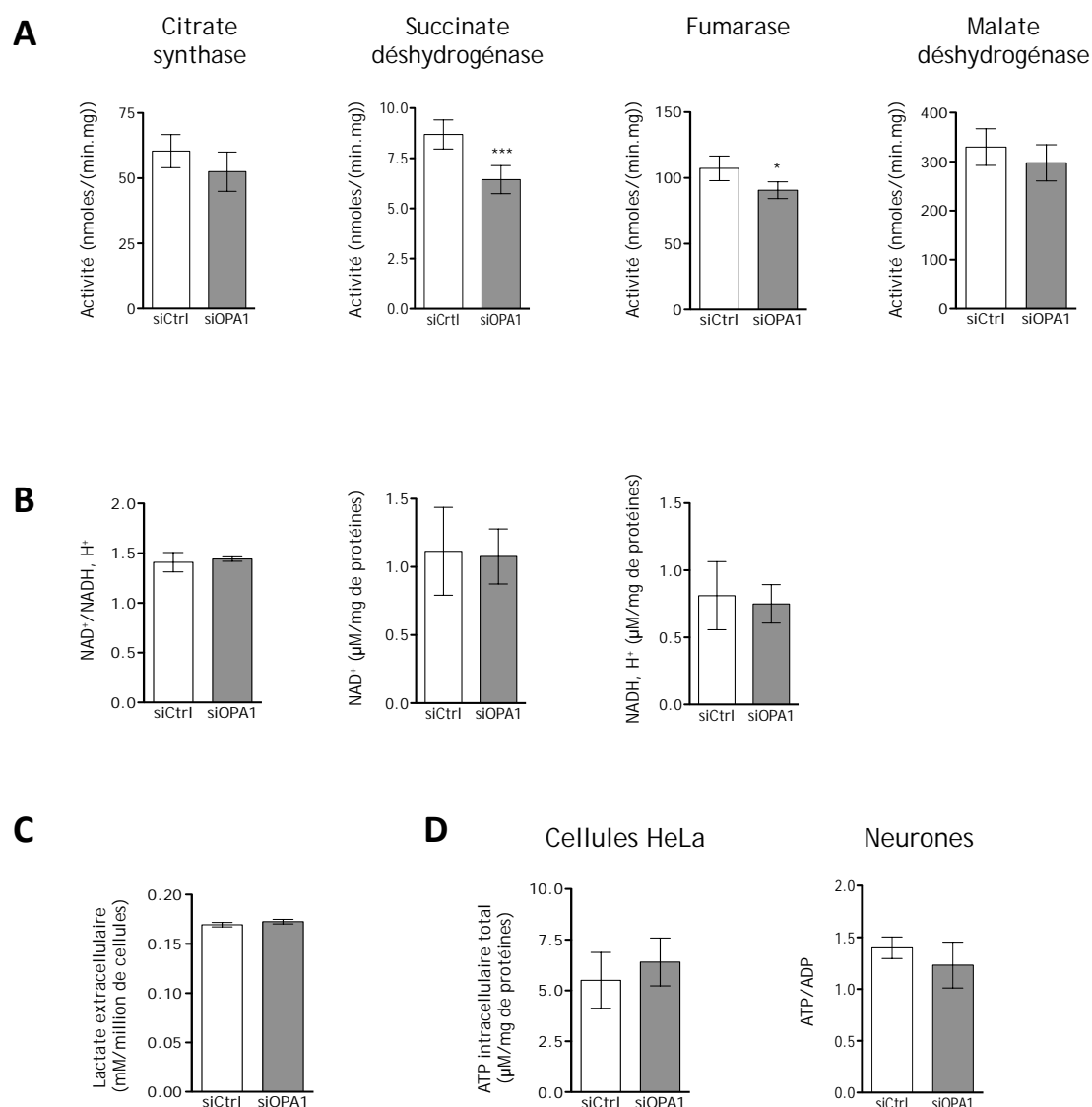


## B Neurones



**Figure 4 – La biomasse mitochondriale n'est pas affectée par la perte d'OPA1 dans les cellules HeLa et les neurones**

Immunoblots et histogrammes représentatifs des quantités protéiques de la citrate synthase (CS), d'HSP60, de VDAC et de TOM20, relatives à l'actine, dans des cellules HeLa (A) (n=4-8) ou des neurones (B) (n=4-5) invalidés ou non pour OPA1. T-test de Student apparié,  $p < 0,001^{***}$ . U.A : Unité Arbitraire.



**Figure 5 – La perte d’OPA1 n’affecte pas le fonctionnement global du cycle de Krebs ni le taux d’ATP intracellulaire total**

(A) Activités enzymatiques mesurées *in vitro*, à partir de lysat de cellules HeLa transfectées par siOPA1 ou siCtrl, de la citrate synthase, la succinate déshydrogénase, la fumarase et la malate déshydrogénase (n=16). (B) Taux intracellulaire total de NADH, H<sup>+</sup> et de NAD<sup>+</sup> et rapport NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup> mesurés dans des cellules HeLa transfectées ou non par siOPA1 (n=5). (C) Taux du lactate extracellulaire mesuré dans le milieu de culture de cellules HeLa transfectées ou non par siOPA1 (n=2). (D) Taux d’ATP déterminé dans les cellules HeLa et rapport d’ATP sur le taux d’ADP dans les neurones invalidés ou non pour OPA1 (n=4). T-test de Student apparié, p<0,05\*, p<0,001\*\*\*.

(Article Bertholet et al., 2003, partie III des résultats, Figure 8). La perte d'OPA1 induit, dans nos conditions, une diminution du nombre de nucléoïdes dans des neurones en culture primaire. Enfin, l'activité isolée des complexes I, II, III et IV *in vitro* indique que seul le complexe II est diminué d'environ 25 % dans les cellules HeLa déplétées pour OPA1 (Figure 3). La diminution de la respiration mitochondriale consécutive à la perte d'OPA1 ne serait pas directement corrélée à un défaut intrinsèque de l'activité des complexes.

La diminution de la respiration dans les cellules déplétées pour OPA1 pourrait être liée à une diminution de la quantité de mitochondries. Les quantités des protéines matricielles HSP60 et citrate synthase et des protéines de la membrane externe VDAC et TOM20, analysées par immunoblot, sont stables aussi bien dans les cellules HeLa (Figure 4A) que dans les neurones (Figure 4B) déplétés pour OPA1. Ainsi, les effets observés sur la chaîne respiratoire ne sont pas liés à une diminution de la biomasse mitochondriale.

La chaîne respiratoire utilise comme substrats le NADH,  $H^+$  et le  $FADH_2$ , produits principalement par le cycle de Krebs au niveau de la matrice mitochondriale. Pour déterminer le fonctionnement global du cycle, nous avons mesuré l'activité de quatre enzymes : la citrate synthase (CS), la succinate déshydrogénase (SDH), la fumarase et la malate déshydrogénase (MDH) (Figure 5A). Seules la SDH (= complexe II) et la fumarase présentent respectivement des diminutions significatives de 25 et 15 % de leur activité dans les cellules HeLa transfectées par siOPA1. L'aconitase, une autre enzyme du cycle de Krebs, a également été mesurée mais les résultats seront présentés dans la partie suivante. Malgré la faible diminution de l'activité de ces enzymes, le rapport de NADH,  $H^+$  sur le taux de  $NAD^+$  est stable dans les cellules HeLa contrôles et traitées par siOPA1 (Figure 5B). Le complexe I serait donc correctement alimenté en substrats et son activité intrinsèque reste stable consécutivement à la perte d'OPA1 (Figure 3A). Nous proposons donc que, dans cette situation, le complexe I continue de capter les électrons du NADH,  $H^+$  mais que le transfert aux autres complexes est ralenti.

Enfin, le taux d'ATP intracellulaire total reste stable dans des cellules HeLa transfectées avec siCtrl ou siOPA1 (Figure 5D). Le ratio d'ATP sur l'ADP total est également inchangé dans les neurones déplétés pour OPA1 (Figure 5D). Ainsi, la perte d'OPA1 n'influence pas la production globale d'ATP dans la cellule. De même, le taux de lactate extracellulaire, reflétant une activation de la glycolyse, est identique dans les cellules HeLa transfectées avec siOPA1 ou siCtrl (Figure 5C).

### **I. 3. 2. Impact de la perte d'OPA1 sur l'état redox**

La diminution de l'activité de la chaîne respiratoire induite par la perte d'OPA1, sans conséquence sur le fonctionnement du cycle de Krebs, suggère une dérégulation de la production de radicaux libres intra-mitochondriaux. Nous avons donc mesuré le taux d'EAO dans des cellules déplétées pour OPA1.

La mesure du taux intracellulaire global d'EAO dans les cellules HeLa, à l'aide de la sonde H<sub>2</sub>-DCFDA, indique que 48h après transfections avec siOPA1 (50 % de diminution de la protéine), le niveau total d'EAO est stable (Figure 6A), mais 72h après transfection, le niveau de radicaux libres est significativement diminué d'environ 25 % (Figure 6A). Dans les neurones, le taux mesuré est également diminué (Article Bertholet et al., 2003, partie III des résultats, Figure 7B).

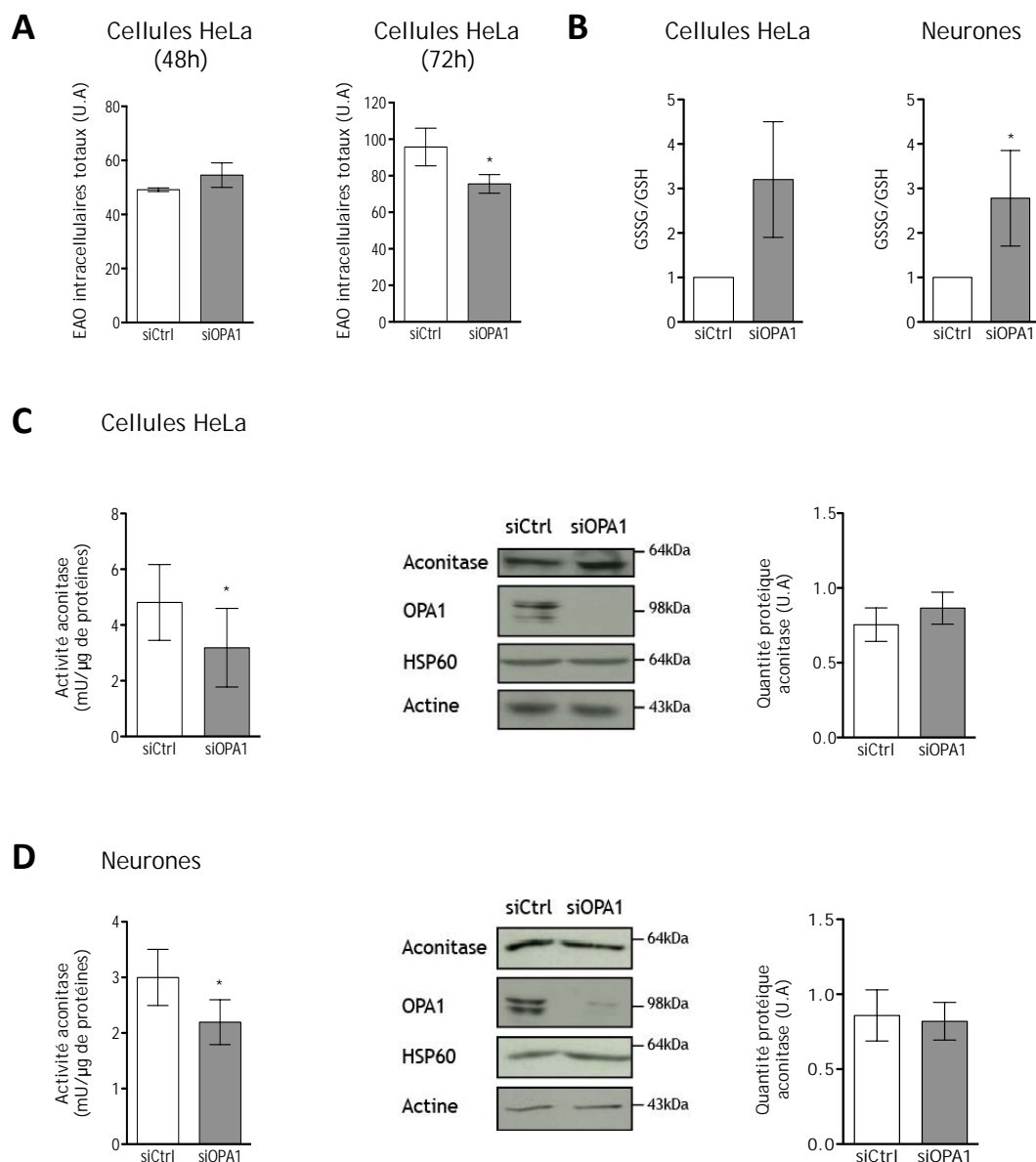
Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : 1) la respiration est diminuée donc la production d'EAO est également diminuée dans les cellules, 2) les défenses antioxydantes de la cellule ont été activées pour tamponner un excès de production de radicaux libres, induit par une perturbation du transit d'électrons.

La mesure de l'activité de l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs sensible à la production d'anion superoxyde, nous a permis de déterminer indirectement le taux d'EAO dans la mitochondrie (Gardner et al., 1994, Vincent et al., 2005 et Kelly et al., 2010). Avec l'aide du Dr Anne Galinier (CHU de Toulouse), nous avons montré que l'activité de l'aconitase diminue d'environ 35 % dans des cellules HeLa (Figure 6C) et dans des neurones (Figure 6D) déplétés pour OPA1. La quantité d'enzyme reste stable dans les cellules traitées ou non avec siOPA1 (Figures 6C et 6D). Ainsi, de manière consécutive à la perte d'OPA1, le niveau d'anion superoxyde produit est supérieur à la normale.

Pour analyser l'état redox des cellules invalidées pour OPA1, nous avons dans un premier temps déterminé le ratio du glutathion réduit (GSH) sur la forme oxydée (GSSG). Ce dosage a été réalisé dans les deux modèles cellulaires, en collaboration avec le Dr Anne Galinier (Figure 6B). Le ratio de GSH/GSSG est élevé, en comparaison avec les ratios obtenus dans les cellules contrôles. Ces résultats indiquent clairement une activation du mécanisme des défenses antioxydantes impliquant au moins le métabolisme du glutathion, témoignant d'une augmentation de la production d'EAO.

### **I. 3. 3. Effets de la perte d'OPA1 sur la voie de signalisation de NRF2**

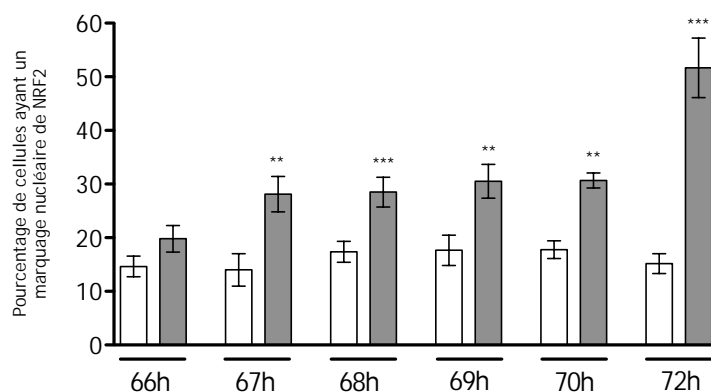
La perte d'OPA1 induit donc une augmentation d'EAO intra-mitochondriaux qui seraient tamponnées par une activation des défenses antioxydantes. L'homéostasie redox des cellules est donc perturbée : la perte d'OPA1 induit un état pro-oxydant. Nous avons approfondi cette étude en



**Figure 6 – L’ tat redox est dérégulé dans des cellules invalidées pour OPA1**

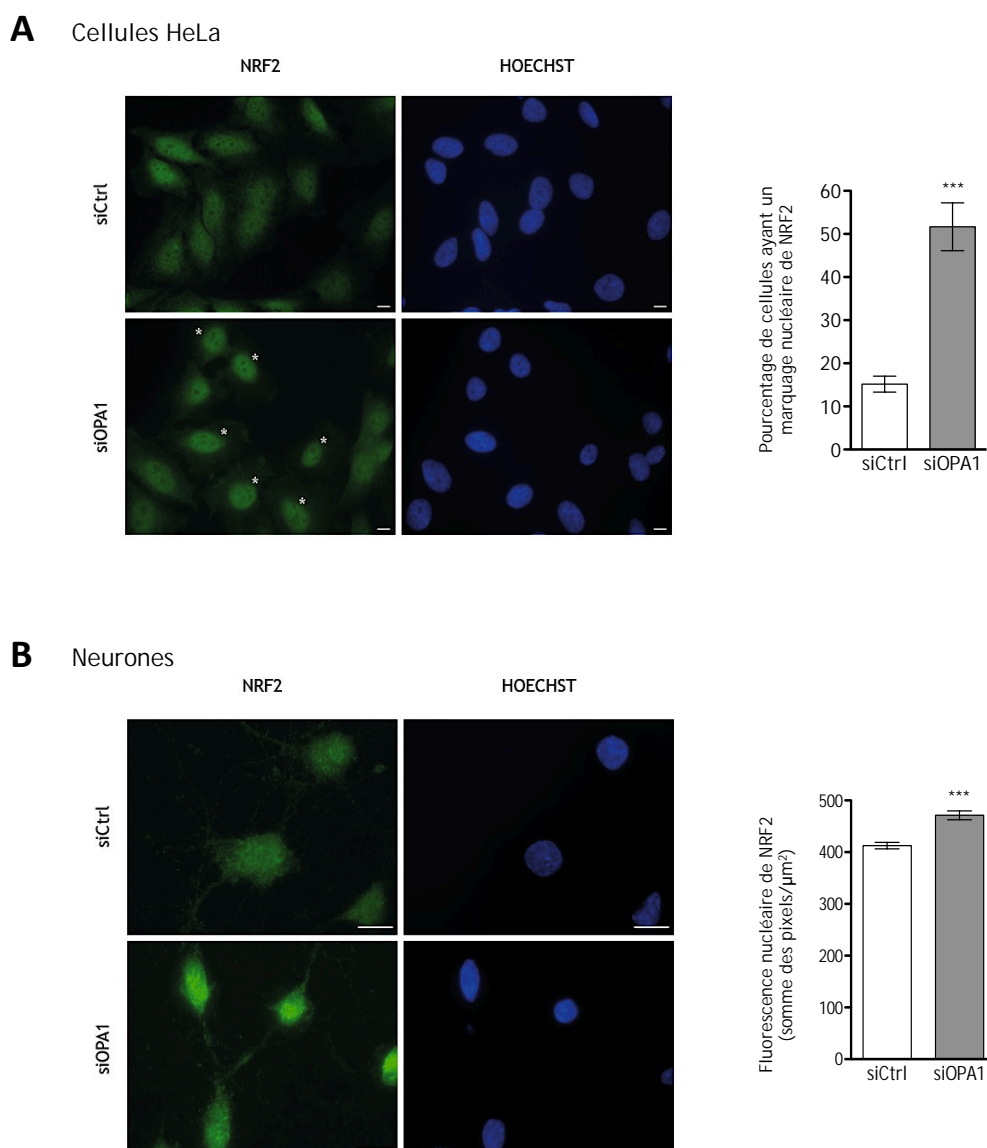
(A) Mesure du taux intracellulaire total d’EAO, à l’aide de la sonde H<sub>2</sub>-DCFDA, dans des cellules HeLa 48h ou 72h après transfection par siCtrl (blanc) ou siOPA1 (gris) (n=4-5). (B) Rapport des formes réduites (GSH) sur oxydées (GSSG) du glutathion dans des neurones et des cellules HeLa, invalidées ou non pour OPA1 (n=4). Activité de l’aconitase mesurée dans des cellules HeLa (C) et des neurones (D) après transfection par siOPA1 ou siCtrl (n=5). Immunoblots et histogrammes représentatifs des quantités protéiques de l’aconitase, relatives à l’actine, dans des cellules HeLa (C) (n=8) ou des neurones (D) (n=6) invalidées ou non pour OPA1. T-test de Student apparié, p<0,05\*. U.A : Unité Arbitraire.





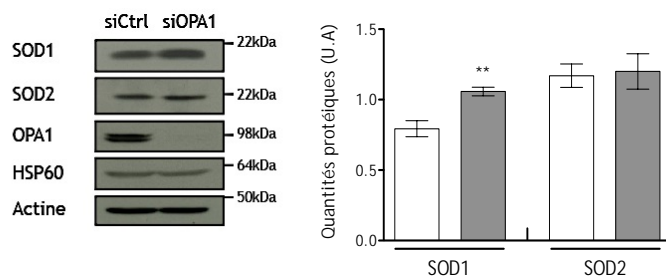
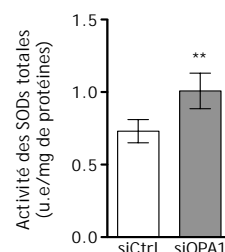
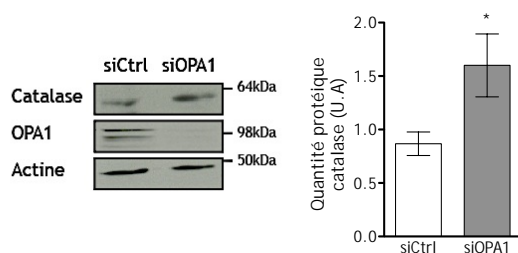
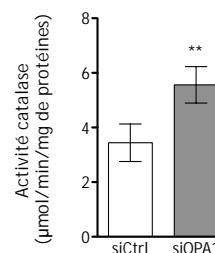
**Figure 7 – Cinétique de translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2 dans des cellules HeLa de 66h à 72h après transfection**

Histogramme représentatif du pourcentage de cellules HeLa présentant un immuno-marquage de NRF2 au noyau (environ 400 cellules comptées par condition), 66h, 67h, 68h, 69h, 70h et 72h après transfection des cellules par siOPA1 ou siCtrl (n=4 à 14). La diminution de la dynamine a été vérifiée par immunoblot à chaque cinétique (environ 80% d'extinction de la protéine OPA1) (données non présentées). T-test de Student apparié,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*.



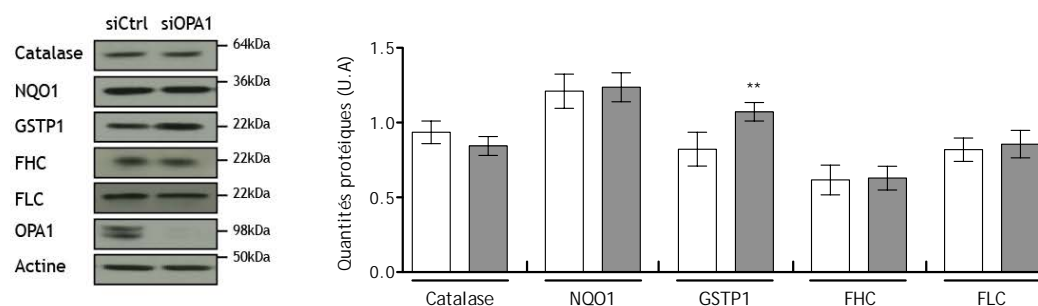
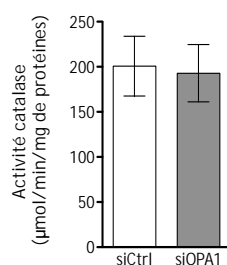
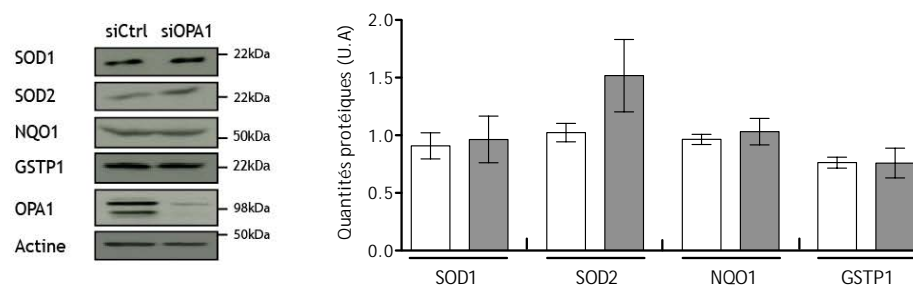
**Figure 8 – La diminution d’OPA1 induit une relocalisation du facteur de transcription NRF2 au noyau, signe de son activation**

(A) Images et histogramme représentatifs d’immunocytofluorescence anti-NRF2 et de coloration des noyaux au Hoechst dans des cellules HeLa transfectées par siOPA1 ou siCtrl puis représentation graphique du pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire de NRF2 (300 à 400 cellules comptées par condition) (n=14). (B) Images et histogramme représentatifs de l’intensité de fluorescence de l’immuno-marquage NRF2 dans le noyau de neurones corticaux, coloré au Hoechst, 6 jours après transfection par siOPA1 ou siCtrl (750 à 850 cellules comptées) (n=5). Test non paramétrique Mann Whitney,  $p < 0,001$ \*\*\*. Echelle : 10 $\mu\text{m}$ .

**A** Cellules HeLa

**B** Cellules HeLa

**C** Neurones

**D** Neurones


**Figure 9 – Les niveaux protéiques et les activités enzymatiques des protéines cibles de NRF2 sont augmentées dans les cellules invalidées pour OPA1 par interférence à l'ARN**

(A) Immunoblots et histogramme représentatifs de la quantité protéique de SOD1 et SOD2, relative à l'actine, dans des cellules HeLa invalidées (gris) ou non (blanc) pour OPA1 (n=8). (B) Activité de la superoxyde dismutase totale (SOD1 + SOD2) dans des cellules HeLa transfectées par siOPA1 ou siCtrl (n=5). (C) Immunoblots et histogramme représentatifs de la quantité protéique de la catalase relative à l'actine, dans des neurones invalidés ou non pour OPA1 (n=8). (D) Activité de la catalase dans des neurones transfectés par siOPA1 ou siCtrl (n=5). T-test de Student apparié,  $p < 0,05$ \*,  $p < 0,01$ \*\* . U.A : Unité Arbitraire.

**A** Cellules HeLa**B** Cellules HeLa**C** Neurones**Figure 10 – Niveaux protéiques d'enzymes antioxydantes cibles de NRF2**

(A) Immunoblots et histogrammes représentatifs des quantités de la catalase, NQO1, GSTP1 et les ferritines (chaînes lourdes FHC ou chaînes légères FLC), relatives à l'actine, dans des cellules HeLa traitées par siOPA1 ou siCtrl (n=7-8). (B) Activité de la catalase dans les cellules HeLa transfectées ou non par siOPA1 (n=7). (C) Immunoblots et histogrammes représentatifs des quantités de SOD1, SOD2, NQO1 et GSTP1 dans des neurones transfectés ou non pour OPA1 (n=8). T-test de Student apparié,  $p < 0,01^{**}$ . U.A : Unité Arbitraire.

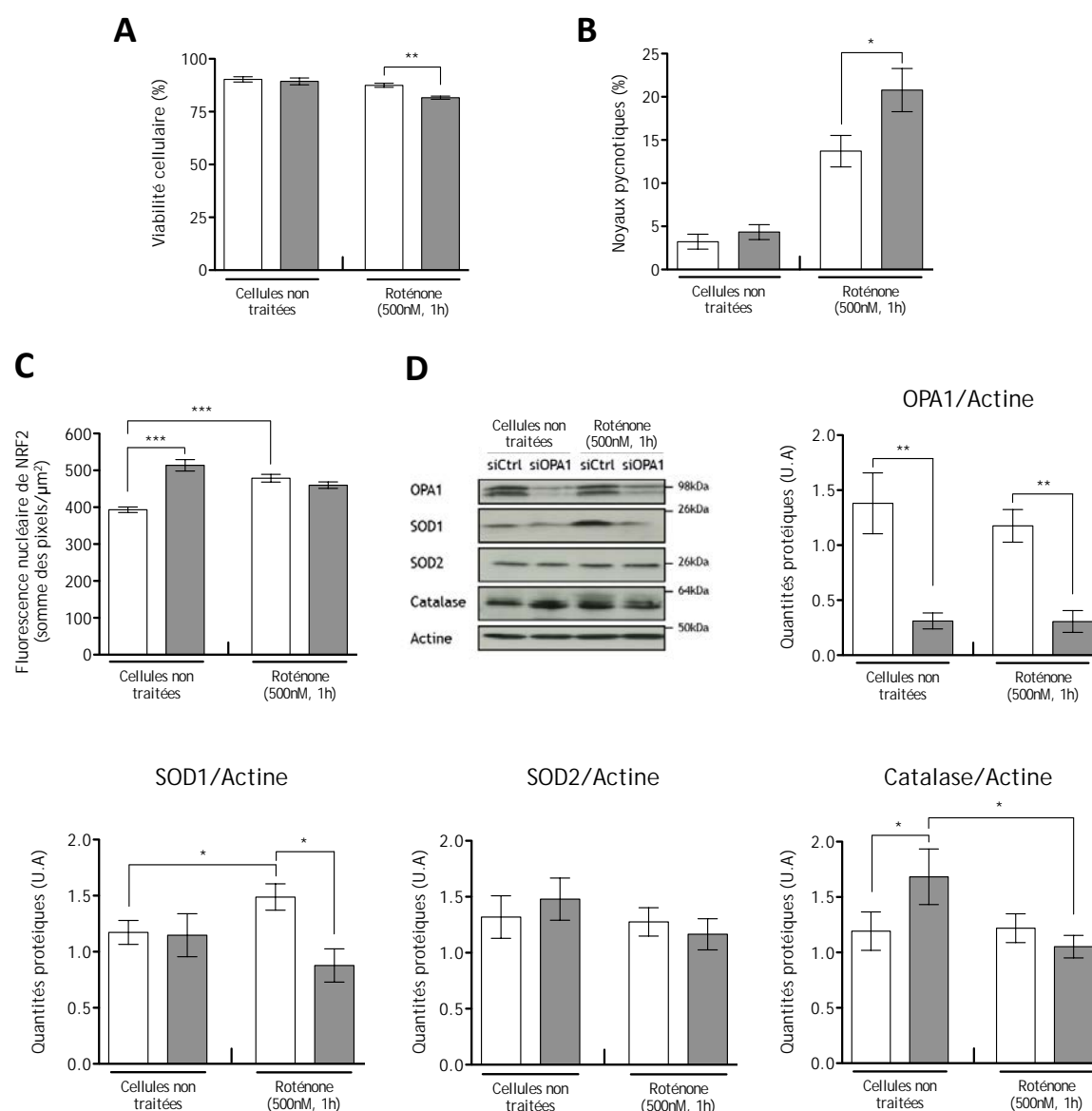
nous intéressant à une des voies de signalisation les plus impliquées en réponse aux taux d'EAO : le facteur de transcription Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2).

Le facteur de transcription NRF2 est séquestré au niveau du cytosol en condition « basale ». En présence d'un taux d'EAO élevé, NRF2 est transloqué dans le noyau et transactive des gènes cibles impliqués dans la détoxification de la cellule. Nous avons donc analysé la localisation subcellulaire de NRF2 par immunocytofluorescence dans des cellules HeLa et des neurones traités ou non par un siOPA1. Dès 67h après transfection, 30 % des cellules HeLa présentent un marquage nucléaire de NRF2 contre 10 % pour les cellules contrôles (Figure 7), et 72h après transfection, cette localisation est visible dans 55 % des cellules (Figure 8A). Dans les neurones dont OPA1 est diminuée, l'intensité de fluorescence nucléaire du marquage NRF2 est de 15 % supérieure à l'intensité mesurée dans les neurones contrôles (siCtrl) (Figure 8B). Ainsi, le facteur de transcription NRF2 est activé dans les deux modèles cellulaires dont l'expression d'OPA1 est diminuée, probablement en réponse à une augmentation du taux d'EAO intracellulaires.

Nous avons alors déterminé la quantité et l'activité de certaines enzymes cibles de NRF2 comme les superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD1 et SOD2), la catalase, GSTP1, NQO1 et les ferritines (Figures 9 et 10). Alors que la quantité et l'activité de la catalase restent stables (Figures 10A et B), la perte d'OPA1 dans les cellules HeLa induit (i) une augmentation d'environ 40 % de l'activité de la SOD qui peut être corrélée à l'augmentation de la quantité de SOD1 de 40 %, et (ii) une augmentation de 30 % de la quantité de GSTP1 (Figures 9A et B, Figure 10D). A l'inverse, les SOD1 et 2 ne sont pas augmentées dans les neurones en culture primaire déplétés pour OPA1 (Figure 10C) alors que l'activité et de la quantité protéique de la catalase augmentent d'environ 70 % (Figures 9C et D). Les quantités de NQO1 et des ferritines (chaînes lourdes et légères) ne sont pas affectées par une diminution d'expression d'OPA1, dans les deux modèles cellulaires (Figures 10E, F, G, H). Ces résultats pourraient expliquer la diminution du taux intracellulaire total des EAO mesuré dans nos modèles.

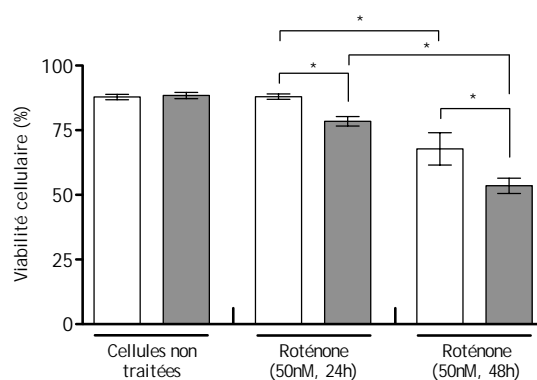
#### **I. 3. 4. Effets d'un stress oxydant sur la viabilité des neurones déplétés pour OPA1**

Les cellules présentent donc une réponse antioxydante activée à l'état « basal ». Pour mimer une condition de stress environnemental que subissent les neurones des patients atteints d'ADOA-1, nous avons choisi de traiter les neurones corticaux primaires par la roténone. Cette molécule est un inhibiteur du complexe I et induit un stress oxydant par une production excessive d'EAO au niveau de ce complexe respiratoire.



**Figure 11 – Les neurones invalidés pour OPA1 sont plus sensibles au stress oxydant aigu induit par la roténone et les défenses antioxydantes sont altérées**

(A) Viabilité cellulaire avant et après traitement à la roténone (500nM, 1h) des neurones invalidés (gris) ou non (blanc) pour OPA1, déterminée au bleu trypan (n=4). (B) Noyaux pycnotiques avant et après traitement aigu par la roténone (500nM, 1h) sur des neurones transfectés par siOPA1 (gris) ou siCtrl (blanc) (n=5). Test non apparié de Welch  $p < 0,05^*$ . (C) Intensité de fluorescence de l'immuno-marquage NRF2 dans le noyau, réalisé dans des neurones traités ou non par la roténone (500nM, 1h), après 6 jours de transfection par siOPA1 (gris) ou siCtrl (blanc) (750 à 850 cellules comptées) (n=5). (D) Immunoblots et histogrammes représentatifs de la quantité d'OPA1, de SOD1, de SOD2 et de la catalase, relative à la quantité d'actine, avant ou après un traitement par la roténone (500nM, 1h), dans des neurones transfectés (gris) ou non (blanc) par siOPA1 (n=6-8). T-test de Student apparié,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . U.A : Unité Arbitraire.



**Figure 12 – Viabilité cellulaire après un traitement chronique des neurones par la roténone**

Traitement chronique par la roténone (50nM) pendant 24 ou 48h sur des neurones invalidés ou non pour OPA1 (n=4). T-test de Student apparié ou non-apparié,  $p < 0,05^*$ .

Dans un premier temps, un stress oxydant « aigu » a été induit par un traitement d'une heure avec 500 nM de roténone, puis les cellules ont été incubées 3h dans un milieu reconditionné. Alors que ce traitement pro-oxydant est sans effet sur la population de neurones transfectés par le siCtrl, la viabilité des cellules dont la quantité d'OPA1 est diminuée baisse significativement (augmentation significative de 7 % de la mortalité) (Figure 11A). De même, le pourcentage de noyaux pycnotiques, signe de la mort cellulaire par apoptose, est plus élevé dans des neurones dont la quantité d'OPA1 (20 %) est diminuée, après un traitement par la roténone, contrairement aux cellules contrôles (14 %) (Figure 11B).

Nous avons ensuite analysé le statut des défenses antioxydantes des cellules dans ces conditions (Figure 11D). Le traitement par la roténone induit une augmentation significative de 25 % de la quantité de SOD1 dans les neurones transfectés par le siCtrl. Les quantités de SOD2 et de la catalase restent stables. Ainsi, les cellules du groupe contrôle sont capables d'induire leurs défenses antioxydantes en réponse à une augmentation d'EAO dans la cellule. Dans les neurones déplétés pour OPA1, les quantités protéiques de SOD1, SOD2 et de la catalase ne sont pas augmentées après le traitement par la roténone. De plus, la quantité de catalase, élevée dans les neurones déplétés pour OPA1 comme nous l'avons montré précédemment, se trouve diminuée de 37,5 % après le traitement par la roténone. Ainsi, lors d'un stress oxydant exogène, les neurones déplétés pour OPA1 ne sont pas capables d'induire une réponse antioxydante, ni de maintenir un niveau d'expression élevé de la catalase. Ces mécanismes pourraient être à l'origine de leur sensibilité à un stress supplémentaire.

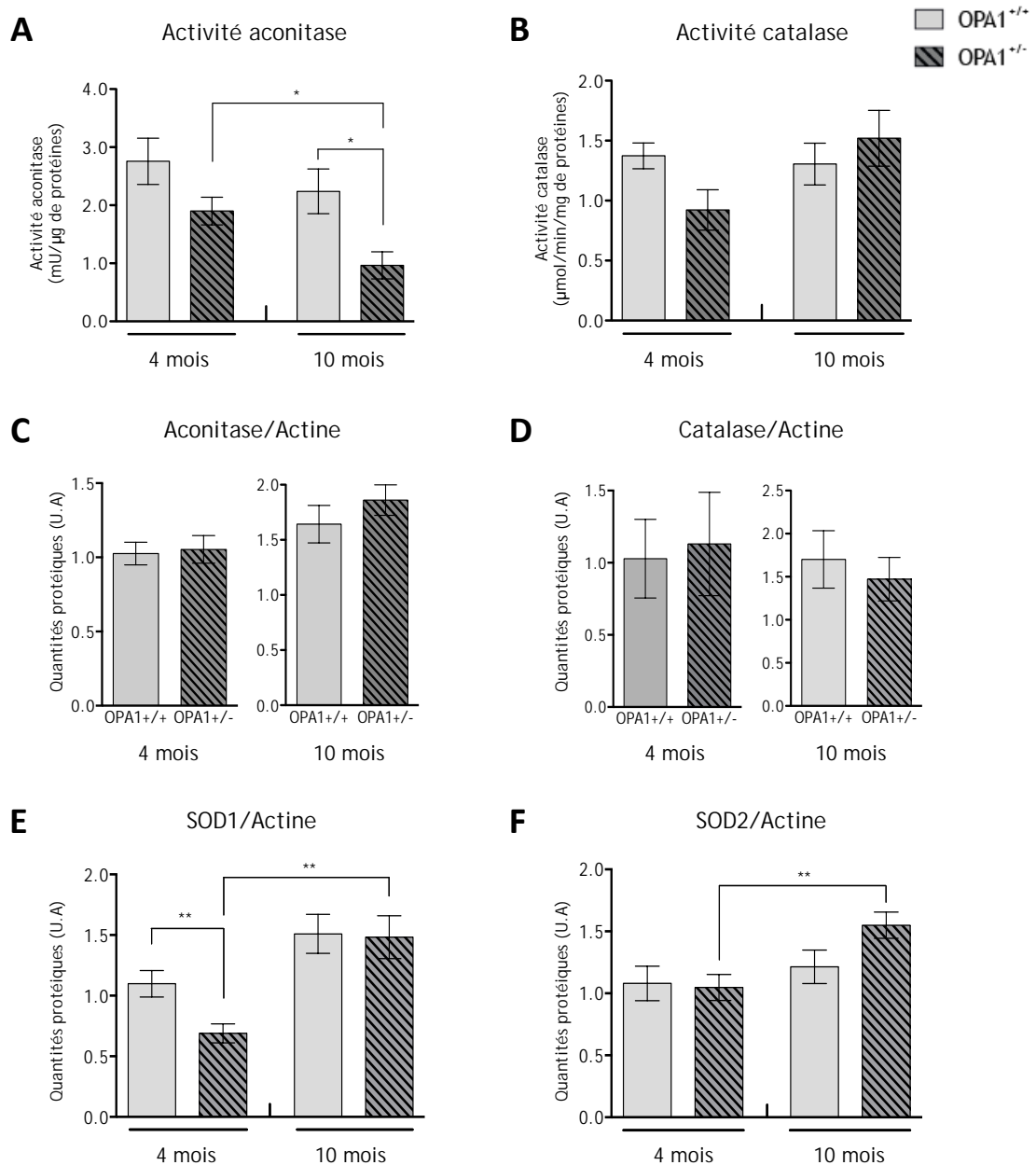
Pour déterminer l'effet d'un stress prolongé, ou « chronique », nous avons incubé les neurones pendant 24h et 48h avec 50 nM de roténone (Figure 12). Dans les deux cas, les neurones déplétés pour OPA1 sont plus sensibles au traitement roténone (75 % de viabilité à 24h et 50 % à 48h) que les cellules contrôles (85 % de viabilité à 24h et 65 % à 48h) comme le montrent les tests de viabilité. Il est à noter que la viabilité de la population neuronale contrôle est diminuée à 48h de traitement alors qu'elle n'est pas affectée à 24h.

Ainsi, la perte d'OPA1 rend les cellules plus sensibles aux stress exogènes « aigus » ou « chroniques ».

### **I. 3. 5. Détermination du statut redox chez les souris *OPA1*<sup>+/-</sup> modèles de l'ADOA-1**

Dans un premier temps, nous avons déterminé de manière indirecte le taux d'EAO dans des cortex de souris modèles de la pathologie de l'ADOA-1 (*OPA1*<sup>+/-</sup>), par mesure de l'activité de l'aconitase (Figure 13A). A 4 mois, l'activité de l'aconitase est diminuée de 34,5 % dans les souris





**Figure 13 – L'état redox des cellules du cortex de souris *OPA1*<sup>+/-</sup> est perturbé**

Activité de l'aconitase (A) et de la catalase (B) dans des cortex de souris sauvages ou mutantes hétérozygotes pour le gène *OPA1*, âgées de 4 (n=10) et 10 mois (n=6). Histogrammes représentatifs des quantités de l'aconitase (C) et de la catalase (D), relatives à l'actine, dans des cortex de souris sauvages ou hétérozygotes mutantes pour le gène codant *OPA1*, âgées de 4 (n=10) à 10 mois (n=6). Histogrammes représentatifs des quantités protéiques de SOD1 (E) et de SOD2 (F), relatives à l'actine, dans des cortex de souris âgées de 4 (n=10) et 10 mois (n=6). T-test de Student non-apparié, avec les corrections de Welch's,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ . U.A : Unité Arbitraire.

*OPA1*<sup>+/-</sup> en comparaison avec les souris sauvages, différence qui s'accroît à 10 mois (60 %). De plus, la diminution de l'activité de l'aconitase s'accroît de 4 à 10 mois chez les souris hétérozygotes pour le gène *OPA1* (diminution de 48 %). La quantité protéique de l'aconitase reste cependant inchangée (Figure 13C).

L'activité et la quantité de la catalase ne sont pas significativement différentes entre les souris contrôles et mutées (Figure 13B). Bien que l'activité de la catalase ne soit pas significativement différente entre les souris contrôles et mutées, elle augmente de 35 % de 4 à 10 mois chez les souris *OPA1*<sup>+/-</sup> (Figure 13D).

Les quantités de SOD1 et SOD2 ont été mesurées dans les cortex de souris sauvages ou mutantes pour le gène *OPA1*, à 4 et 10 mois (Figures 13E et F). Bien que les quantités restent stables en comparaison au groupe contrôle, la quantité de SOD1 diminue significativement de 45 % chez les souris mutées, à 4 mois. De plus, nous pouvons observer une augmentation significative de la quantité protéique de SOD1 (55 %) et de SOD2 (35 %) entre 4 et 10 mois chez les souris *OPA1*<sup>+/-</sup>.

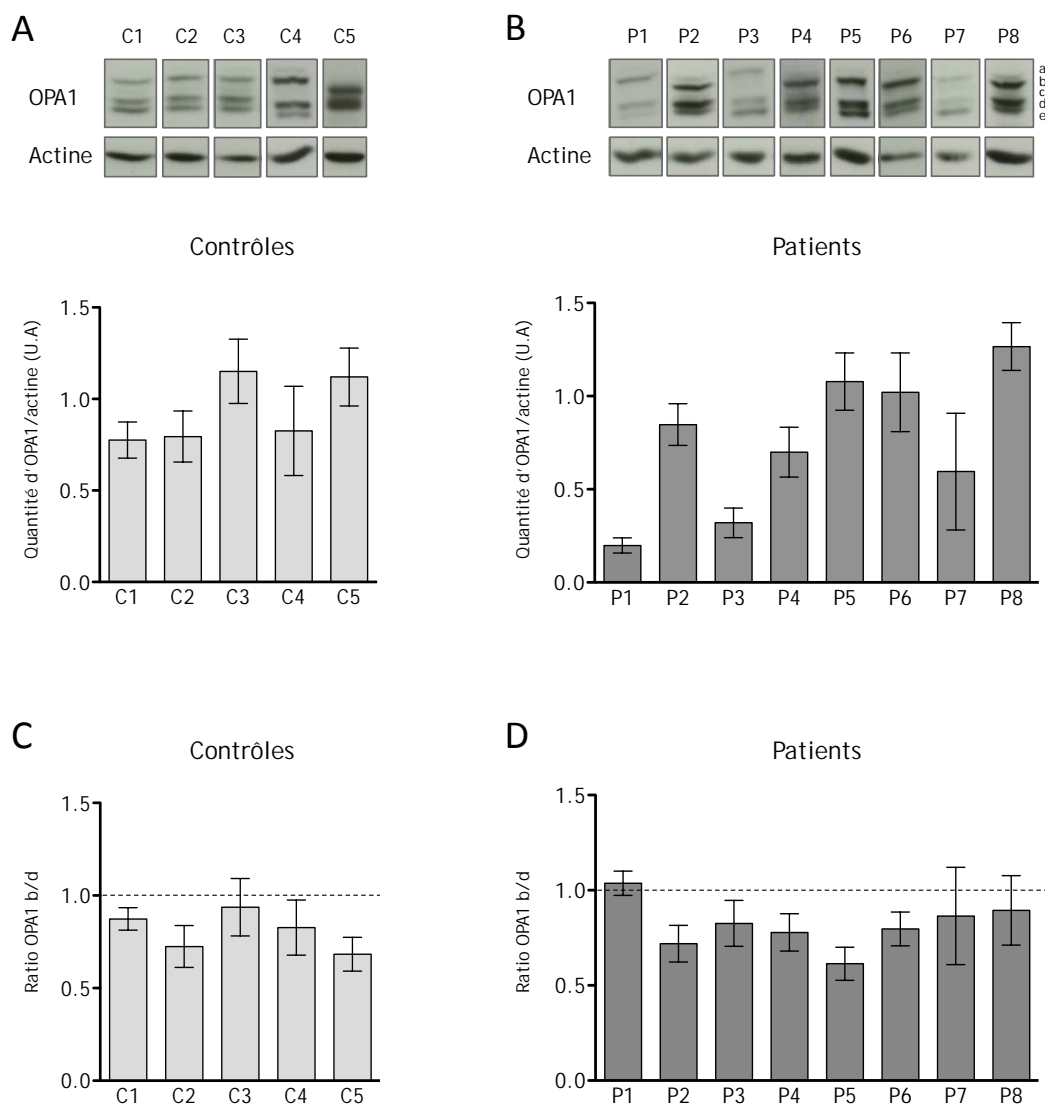
Les souris modèles de la pathologie de l'ADOA-1 sont donc dans un état pro-oxydant.

### **I. 3. 6. Caractérisation du statut antioxydant de fibroblastes issus de peau de patients atteints d'ADOA-1**

Afin de déterminer la contribution d'une altération des défenses antioxydantes dans la pathogenèse de l'ADOA-1, nous avons caractérisé le statut de la réponse antioxydante dans des fibroblastes de patients.

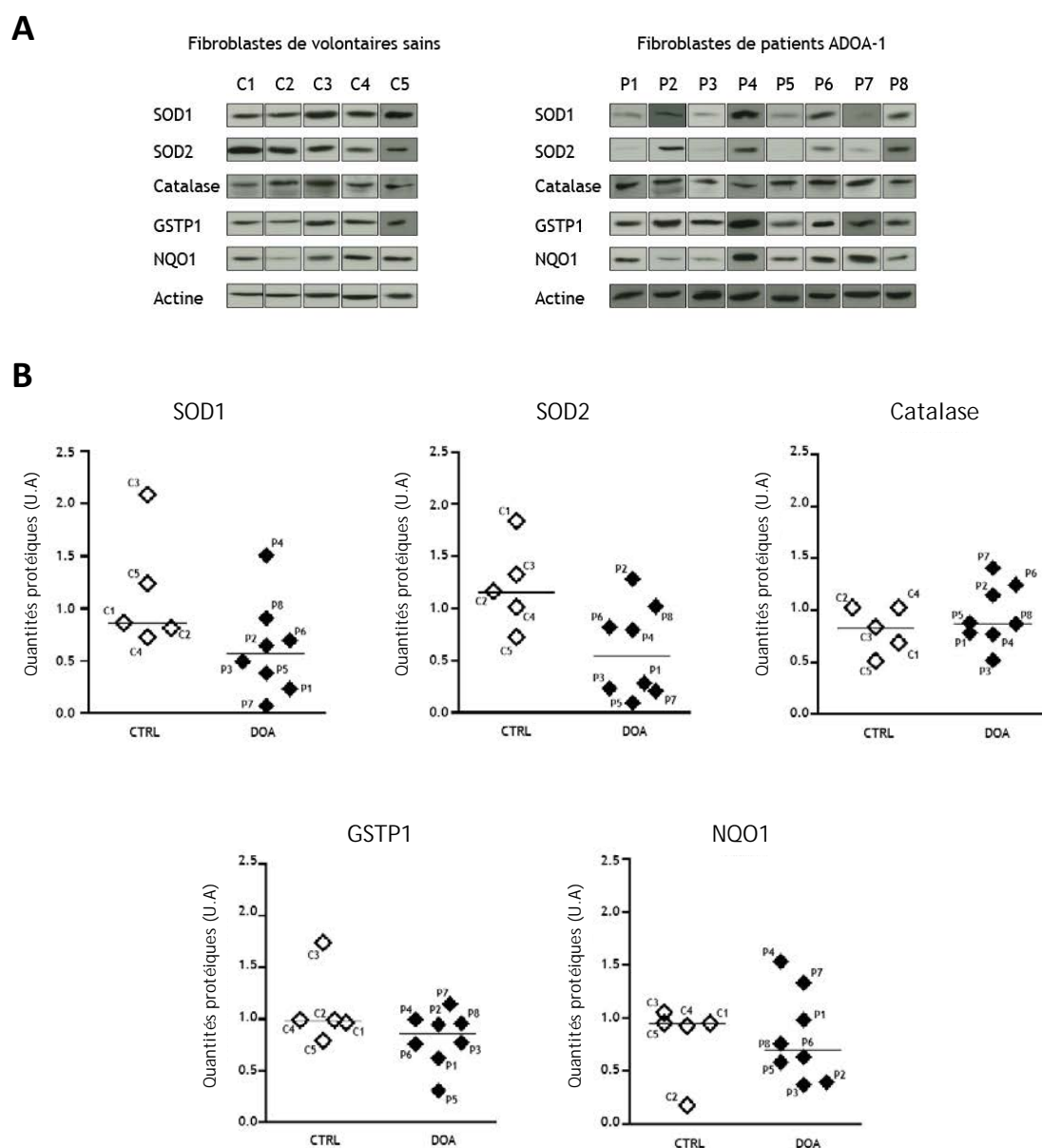
Dans un premier temps, nous avons déterminé la quantité protéique d'OPA1 chez les fibroblastes contrôles (C1 à C5) et de patients (P1 à P8) (Figures 14A et B). Les cultures de fibroblastes issus de 4 patients expriment des niveaux d'OPA1 inférieurs au groupe contrôle (P1, P3, P4 et P7). De plus, nous pouvons suggérer que les patients P1 et P3 présentent une « haploinsuffisance sévère » pour la dynamine. Sachant que le ratio de la forme longue d'OPA1 sur la forme courte est un paramètre important contrôlant la fonction de la protéine (Ishihara N. et al., 2006), nous avons estimé ce ratio dans les deux groupes de fibroblastes (Figures 14C et D). Les ratios indiquent que la forme courte est légèrement plus exprimée que la forme longue, mais il n'y a pas de différences significatives entre les groupes contrôles ou mutés pour la dynamine OPA1.

La quantité de 5 cibles du facteur de transcription NRF2, dont SOD1, SOD2 et la catalase, a été analysée par immunoblot dans des fibroblastes issus des volontaires sains et des patients atteints d'ADOA-1 (Figure 15). La quantité de chaque enzyme est hétérogène, aussi bien chez les contrôles



**Figure 14 – Quantité protéique d'OPA1 dans les fibroblastes**

La quantité de protéine OPA1 relative à la quantité d'actine, a été estimée par immunoblot (A) dans des fibroblastes « contrôles » (C1 à C5) et (B) issus de patients atteints d'ADOA-1 (P1 à P8). Ces expériences ont été réalisées de 3 et 6 fois par individu. Cinq isoformes d'OPA1 sont détectées par l'anticorps anti-OPA1, notées de a à e. Les formes b (forme longue) et d (forme courte) sont prépondérantes dans les fibroblastes humains. Les rapports des formes longues sur les formes courtes d'OPA1 ont été mesurés chez les contrôles (C) et les patients (D). U.A : Unité Arbitraire.



**Figure 15 – Les défenses antioxydantes sont diminuées chez certains patients atteints d’ADOA-1**  
 (A) Immunoblots anti-SOD1, SOD2, catalase, GSTP1, NQO1 et actine à partir de lysat de fibroblastes de patients atteints d’ADOA-1 (P1 à P8) et de volontaires sains (C1 à C5). (B) Histogrammes représentatifs des quantités protéiques des différentes enzymes relatives à l’actine. Chaque point représente une moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes dans les deux groupes d’individus. U.A : Unité Arbitraire.

que les patients, et n'est corrélé ni avec l'âge, ni avec le sexe des individus. Toutefois, les fibroblastes de 4 patients (P1, P3, P5 et P7) présentent une quantité de SOD1 et de SOD2 inférieure au groupe contrôle. Rappelant les résultats obtenus dans les neurones traités par sOPA1, la quantité de la catalase est plus élevée chez les patients P2, P6 et P7, en comparaison au groupe contrôle. Cette enzyme serait donc activée en réponse à la perte de fonction d'OPA1 chez ces patients. Le niveau protéique de GSTP1 est comparable dans les deux groupes, seuls les fibroblastes du patient P5 présentent une quantité plus faible de l'enzyme. Enfin, bien qu'hétérogène chez les patients atteints d'ADOA-1, la quantité protéique de NQO1 est élevée chez les individus P4 et P7.

Suite à ces résultats, nous pouvons proposer trois groupes d'individus : 1) une population dans laquelle les défenses antioxydantes sont induites, comme dans nos modèles cellulaires, 2) un groupe qui présente des réponses antioxydantes très faibles et 3) des personnes chez lesquelles le niveau d'enzymes détoxifiantes est comparable à celui du groupe contrôle.

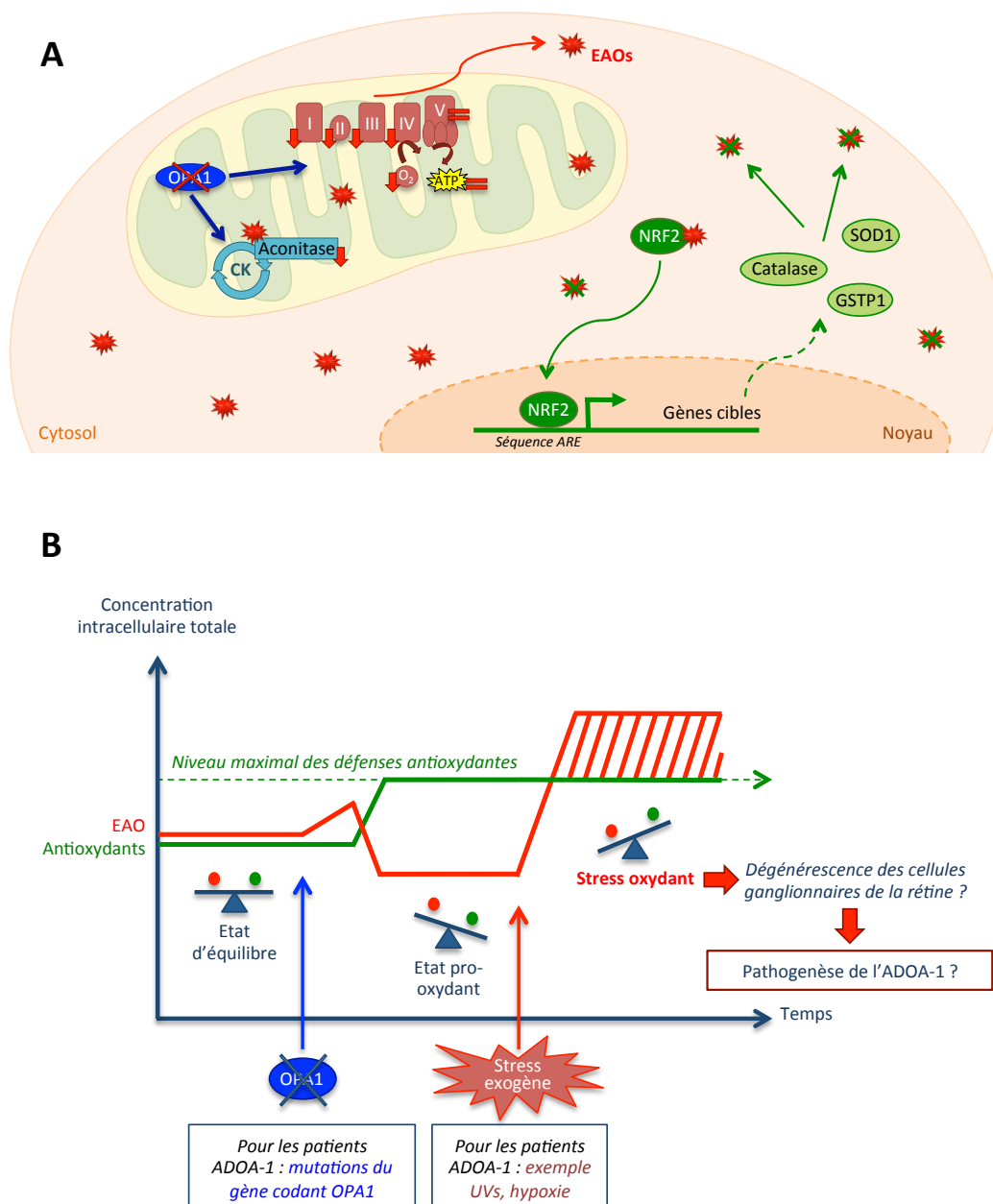
## I. 4. Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de déterminer pour la première fois l'impact de l'inactivation d'OPA1 sur l'homéostasie redox (Figure 16).

Pour résumé, nous avons montré dans un premier temps que la respiration cellulaire spontanée est diminuée significativement, dans les cellules HeLa et les neurones traités par un ARN interférant (siOPA1). La respiration n'est pas augmentée après l'ajout d'un agent découplant, ce qui suggère que la respiration des cellules déplétées pour OPA1 est déjà maximale. La quantité de certaines sous-unités des complexes I, II, III et IV est diminuée, ce qui pourrait expliquer en partie le défaut respiratoire mesuré dans ces cellules.

La production d'anion superoxyde est augmentée, révélée de manière indirecte par la diminution de l'activité de l'aconitase dans les deux modèles cellulaires déplétés pour OPA1. Les données issues des modèles *in vitro* ont été confirmées par l'analyse *in vivo* dans des cortex de souris de modèles de l'ADOA-1 (B6;C3-OPA1<sup>329-355del</sup>). En effet, les animaux présentent une diminution drastique de l'activité de l'aconitase à 4 et 10 mois, caractéristique d'une production élevée d'EAO mitochondriaux. Ainsi, les modèles cellulaires et animaux de l'ADOA-1 sont dans un état pro-oxydant.

Cependant, la mesure d'EAO totaux *in vitro* montre une diminution d'environ 25 % dans les deux modèles cellulaires. Cette diminution globale serait la conséquence secondaire d'une activation des défenses antioxydantes. En effet, NRF2 est transloqué au noyau, signe de son activation



**Figure 16 – Mécanismes moléculaires mis en jeu lors d'une diminution d'OPA1**

(A) Représentation schématique résumant les résultats obtenus dans les neurones et dans les cellules HeLa, respectivement 6 jours et 72h après transfection avec un siOPA1. (B) Schéma récapitulatif du niveau intracellulaire d'EAO (rouge) et des défenses antioxydantes (vert) suite à la diminution d'OPA1 (siARN ou mutations du gène) et des stress exogènes (roténone ou environnement comme UVs ou hypoxie).

consécutives à la diminution d'OPA1. De plus, certaines enzymes cibles de NRF2, comme les superoxydes dismutase 1 et 2 (SOD1/2), la catalase et GSTP1, voient leur quantité et/ou leur activité augmentées.

Lors de l'application d'un stress oxydatif exogène aigu induit par la roténone, un inhibiteur du complexe I, les défenses antioxydantes ne sont pas activées dans les neurones traités par un siOPA1 et meurent plus que les cellules contrôles. De plus, les neurones sont également plus sensibles au stress chronique induit par un traitement roténone de longue durée. Ainsi, la perte d'OPA1 sensibilise les cellules au stress oxydatif supplémentaire.

Le mécanisme que nous avons mis à jour pourrait contribuer à la pathogenèse de l'ADOA-1. Nous avons par conséquent caractérisé le profil antioxydant de fibroblastes de peau de patients atteints d'ADOA-1. Un groupe de patient répond comme les modèles cellulaires que nous avons analysé, leurs défenses antioxydantes sont plus élevées que les contrôles, notamment la catalase. De façon intéressante, certains individus présentent clairement des niveaux protéiques des enzymes de détoxification SOD1 et 2 très faibles. Nous suggérons que ces patients seraient encore plus fragiles face aux stress exogènes tels que les UVs ou l'hypoxie, ce qui pourrait constituer un facteur aggravant et accélérateur de la pathologie.

Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes pour la compréhension de la pathogenèse de l'ADOA-1 et permettent de proposer des perspectives thérapeutiques à court terme, comme l'utilisation de molécules antioxydantes directes (piégeurs d'EAO) ou indirectes (ARE-inducers), pour prévenir ou ralentir l'atrophie optique et/ou les syndromes extra-oculaires des patients. Ces données nous ont permis de déposer un **brevet d'invention européen le 27 mars 2014 (n°EP14305448) « *Method, process and kit for prognosis of OPA1 gene or OPA1 gene product-deficit induced diseases* »**. Dans ce brevet, nous proposons la mise en place d'un test pronostic pour les patients qui présentent des dysfonctions du gène OPA1, donc principalement atteints d'ADOA-1, et des stratégies thérapeutiques ciblées pour la prise en charge des patients.

## II. Identification des partenaires d'OPA1 par protéomique

### II. 1. Contexte et objectifs

De nombreuses fonctions sont attribuées à la protéine OPA1 comme la fusion des membranes internes mitochondriales, le maintien de l'ADN mitochondrial et un rôle anti-apoptotique. L'identification des partenaires d'OPA1 devrait permettre de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions de la dynamine et améliorer nos connaissances des mécanismes physiopathologiques de l'ADOA-1.

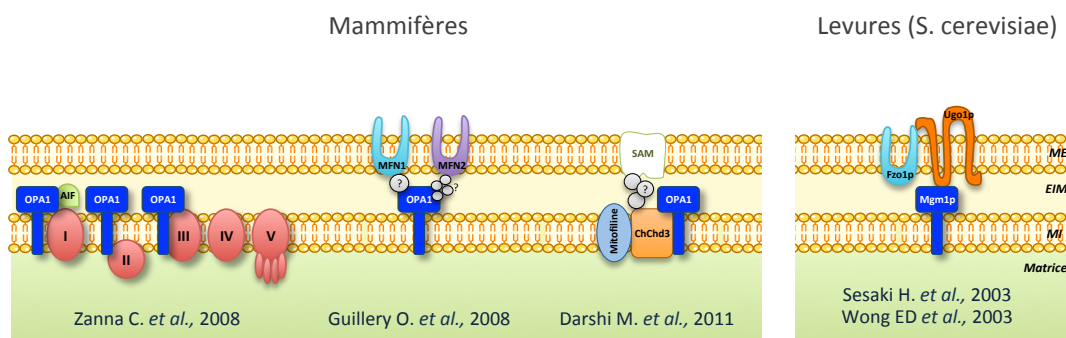
Cependant, peu de partenaires protéiques d'OPA1 ont été identifiés. Les travaux de Zanna et collègues publiés en 2008 et réalisés sur des fibroblastes issus de personnes contrôles ou de patients atteints d'ADOA-1, ont montré des interactions par co-immunoprécipitation entre OPA1 et NDUF9 (sous-unité du complexe I), une sous-unité de 70kDa du complexe II (flavoprotéine) et Core 2 (sous-unité du complexe III). Cette étude a également révélé une interaction avec AIF (Apoptosis-Inducing Factor), une protéine localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial et qui intervient notamment dans l'assemblage et le maintien du complexe I (Polster 2013). Ainsi, le complexe AIF/OPA1 permettrait de réguler et de stabiliser la chaîne respiratoire (Sevrioukova 2011) (Figure 17A).

Une autre étude réalisée dans l'équipe de Manuel Rojo, en collaboration avec notre équipe, a montré en 2008 des interactions entre OPA1 et les Mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) dans des cellules HeLa (Guillery et al. 2008) (Figure 17A). De même, chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine *mgm1p* (orthologue d'OPA1) interagit de manière indirecte avec *Fzo1p*, l'orthologue des MFNs, par l'intermédiaire de la protéine *Ugo1p* (Sesaki and Jensen 1999)s (Figure 17A). Chez les mammifères, les protéines intermédiaires permettant l'interaction d'OPA1 avec les MFNs, comme par exemple un analogue de *Ugo1p*, n'ont toujours pas été identifiées.

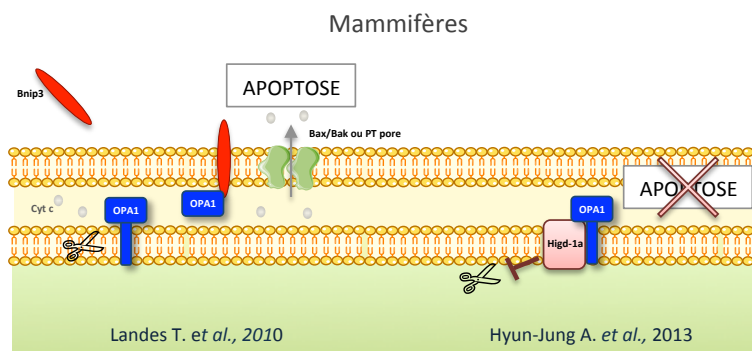
Récemment, un nouveau partenaire d'OPA1 a été révélé dans des cellules HEK293 : la protéine ChChd3 de fonction encore inconnue (Darshi et al. 2011; Zerbes et al. 2012) (Figure 17A). Cette protéine, un des nombreux substrats de la protéine kinase A (PKA), est ancrée à la membrane interne (MI) des mitochondries. Cette étude montre, par des expériences de co-immunoprécipitation, des interactions entre la protéine ChChd3, OPA1, Mitofiline et SAM50. La Mitofiline est une protéine de la MI mitochondriale qui contrôle la structure des crêtes, une des fonctions également attribuée à la dynamine OPA1 (Darshi et al. 2011; Zerbes et al. 2012). SAM50 est une sous-unité du complexe d'import de protéines mitochondrial (Sorting and Assembly Machinery complex), spécialisée dans



## A. Normoxie



## B. Hypoxie (0,1% O<sub>2</sub>)



**Figure 17 – Partenaires protéiques d'OPA1 connus à ce jour**

Quelques études révèlent des interactants d'OPA1 en condition normale (normoxie) (A) ou en hypoxie (0,1% d'oxygène) (B), chez les mammifères et dans les levures.

l'assemblage des protéines à feuillets-beta, et localisée à la membrane externe (Ott et al. 2012). Ces résultats suggèrent un rôle de ChChd3 comme protéine chaperonne qui permet de stabiliser des complexes protéiques intervenant dans l'architecture des crêtes mitochondriales et l'import de protéines.

Certains partenaires d'OPA1 ont été révélés par des études réalisées sur des cellules en hypoxie (Figure 17B). Des travaux menés par notre équipe ont montré que l'adressage à la membrane externe mitochondriale du facteur pro-apoptotique BNIP3 en condition d'hypoxie (0,1 % oxygène) induit la déstructuration des oligomères d'OPA1 dans des cellules HeLa. Ce phénomène aboutit à la fission mitochondriale et à la mort des cellules par apoptose (An et al. 2013; Landes et al. 2010; Landes et al. 2010). Récemment, un nouveau partenaire d'OPA1 a été identifié dans les cellules HeLa et HEK293T : Higd-1a. Cette protéine est localisée dans la membrane interne mitochondriale et joue un rôle dans la survie des cellules en condition d'hypoxie (0,1 % oxygène). Higd-1a interagit uniquement avec la forme longue d'OPA1, ce qui suggère un domaine d'interaction perdu lors du clivage d'OPA1, responsable de la forme courte. L'interaction Higd-1a/OPA1 empêche le clivage de la dynamine et par conséquent protège les cellules de la mort par apoptose induite en condition d'hypoxie (An et al. 2013; Landes et al. 2010). Ainsi, OPA1 serait une cible préférentielle pour moduler les effets de l'hypoxie sur les cellules et serait au cœur de la balance survie/apoptose.

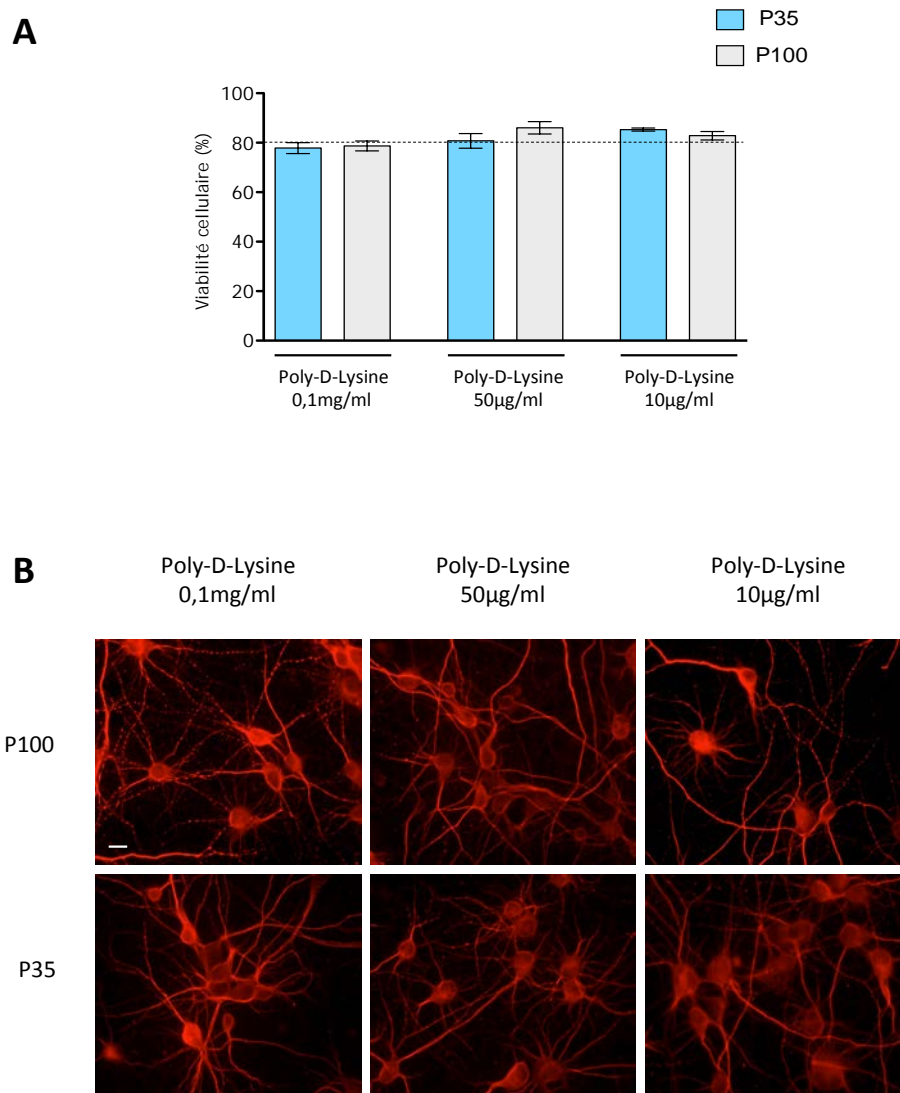
Pour identifier les partenaires protéiques d'OPA1, nous avons choisi de dresser l'interactome de la dynamine dans des neurones corticaux en culture primaire, en mettant en œuvre des expériences de co-immunoprécipitation suivies d'identification des protéines par spectrométrie de masse.

## II. 2. Modèle expérimental et méthodologie

Pour obtenir des échantillons exploitables par spectrométrie de masse, de nombreuses mises au point ont été réalisées. Ces étapes sont essentielles dans une approche de protéomique, je décrirai donc plus précisément les mises au point que j'ai dû réaliser pour mener à bien cette étude.

### II. 2. 1. Le modèle choisi

Pour l'identification de l'interactome d'OPA1, notre choix s'est porté sur des neurones corticaux embryonnaires en culture primaire, préparation largement décrite et utilisée dans la littérature (Bertholet et al. 2013; D. T. W. Chang and Reynolds 2006). D'après des analyses d'électrophysiologie réalisées par Ambre Bertholet, les neurones en culture primaire que nous



**Figure 18 – Tests de viabilité des neurones corticaux et de la croissance dendritique pour la mise au point des conditions de culture, pour les expériences de protéomique**

(A) Ensemencement des neurones dans des boîtes de P35 (600 000 cellules par boîte) et P100 (4 millions de cellules par boîte), préalablement incubées avec de la poly-D-Lysine (0,1mg/ml, 50 ou 10µg/ml). La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration au Bleu Trypan, 9 jour après ensemencement (n=2). (B) Marquage des dendrites par immunocytofluorescence anti-MAP2 réalisée au 9<sup>ème</sup> jour de culture (n=2). Echelle : 5µm.

utilisons au laboratoire ont une activité électrique dès 8 jours de culture (Days In Vitro 8, DIV8) (données non publiées). Nous avons donc choisi d'utiliser les cellules à DIV9 pour identifier les partenaires d'OPA1 dans des cellules matures et fonctionnellement actives.

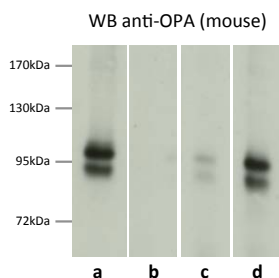
### II. 2. 2. Les techniques utilisées et les mises au point

Pour détecter et identifier les partenaires d'une protéine par spectrométrie de masse, il est nécessaire d'analyser des immunoprécipités réalisés à partir de 3 à 4 mg de protéines. J'ai donc mis au point les conditions de culture de neurones dans des boîtes de 10 cm de diamètre (P100) et testé différentes concentrations du revêtement de poly-D-Lysine (0,1 mg/mL, 50 µg/mL ou 10 µg/mL). La viabilité cellulaire, estimée par une coloration des cellules au Bleu Trypan, est meilleure (environ 85 %) dans les boîtes P100 préalablement incubées avec 50 µg/mL de poly-D-Lysine (Figure 18). De même, dans cette condition de culture, les dendrites, observées par immunocytofluorescence avec un anticorps anti-MAP2, présentent une croissance normale, en comparaison aux cultures effectuées dans les boîtes P35 (35 mm) couramment utilisées au laboratoire.

L'objectif étant de réaliser un interactome de la protéine mitochondriale OPA1, nous avons donc choisi d'isoler les mitochondries par un protocole utilisé couramment au laboratoire. Or ce protocole ayant été mis au point pour des cellules HeLa et des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts), j'ai adapté les conditions expérimentales pour les neurones, qui ont une morphologie différente et une membrane plasmique plus difficile à lyser (confer Matériels et Méthodes).

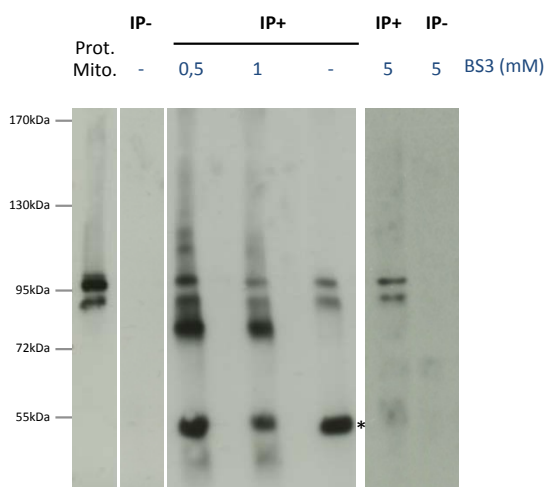
Pour la technique d'immunoprécipitations (IP), nous avons choisi d'utiliser des billes magnétiques (Dynabeads) car elles sont capables de retenir des complexes protéiques de très grande taille, contrairement aux billes de sépharose couramment utilisées. J'ai testé deux types d'anticorps (Ac) anti-OPA1, un Ac polyclonal produit chez le lapin et un Ac monoclonal obtenu chez la souris. Le rendement d'immunoprécipitation de l'Ac anti-OPA1 de souris est 7 fois plus important que l'Ac de lapin (Figure 19).

Pour lier de façon covalente l'anticorps utilisé pour l'IP aux protéines G des billes magnétiques afin d'éviter que les chaînes lourdes et légères des IgGs présentes en grande quantité dans l'échantillon masquent les peptides endogènes, nous avons utilisé le bissulfosuccinimidyl suberate (BS3, Sigma), un agent pontant irréversible. Les conditions expérimentales que nous avons retenues, sont une incubation des billes et de l'anticorps avec 5 mM de BS3 pendant 30 minutes. La réaction de « cross-link » a été inhibée avec 50 mM de Tris HCL à pH=7,5 pendant 15 minutes à température ambiante (Figures 20 et 21).



**Figure 19 – Choix de l'anticorps pour les immunoprécipitations d'OPA1**

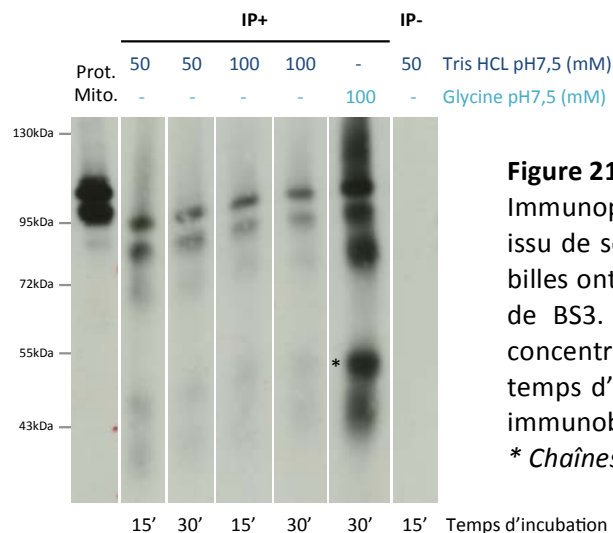
Immunoprécipitations sans anticorps (IP-), avec un anticorps issu de lapin (polyclonal) ou avec un anticorps issu de souris (monoclonal), à partir de 500µg de protéines. a : input (extrait protéique) 75µg, b : IP-, c : IP+ (Lapin), d : IP+ (Souris). OPA1 a été révélé par immunoblot avec l'anticorps de souris commercial. Le rendement d'immunoprécipitation est 7 fois plus important dans la condition IP+ (souris).



**Figure 20 – Utilisation de différentes concentrations de BS3 et impact sur la qualité de l'immunoprécipitation (IP)**

Immunoprécipitations sans anticorps (IP-) et avec un anticorps issu de souris (IP+) réalisées à partir de 120µg de protéines. Les billes ont été pré-incubées avec l'anticorps en présence de différentes concentrations finales de BS3 et le cross-link a été arrêté pendant 15 minutes avec 50mM de Tris HCL pH7,5. OPA1 a été révélé par immunoblot avec l'anticorps de souris commercial.

\* Chaînes lourdes des IgGs.



**Figure 21 – Choix de l'inhibiteur du cross-link induit par le BS3**

Immunoprécipitations sans anticorps (IP-) et avec un anticorps issu de souris (IP+) réalisées à partir de 300µg de protéines. Les billes ont été pré-incubées avec l'anticorps en présence de 5mM de BS3. L'arrêt du cross-link a été effectué avec différentes concentrations de Tris HCL pH7,5 ou de glycine pH7,5 et des temps d'incubation de 15 et 30 minutes. OPA1 a été révélé par immunoblot avec l'anticorps de souris commercial.

\* Chaînes lourdes des IgGs.

Une fois les conditions mises au point, nous avons réalisé les 3 expériences de protéomique. Nous avons le choix de faire analyser l'échantillon entier, ou de le séparer sur gel SDS-PAGE puis de découper le gel et analyser les pistes d'intérêts. Nous avons choisi la deuxième solution pour séparer OPA1 et ses interactants selon leur masse moléculaire apparente afin de concentrer des espèces moins abondantes et permettre ainsi une meilleure identification des peptides par le spectromètre de masse. Pour cela, nous avons procédé à une coloration argentique du gel (Figure 22). Dans les expériences 2 et 3, les différentes isoformes de la protéine OPA1 sont visibles (#). En effet, ces expériences ont été réalisées avec une plus grande quantité de protéines mitochondriale, respectivement 3,8 et 5,5 mg, que pour l'expérience 1 (2,2 mg).

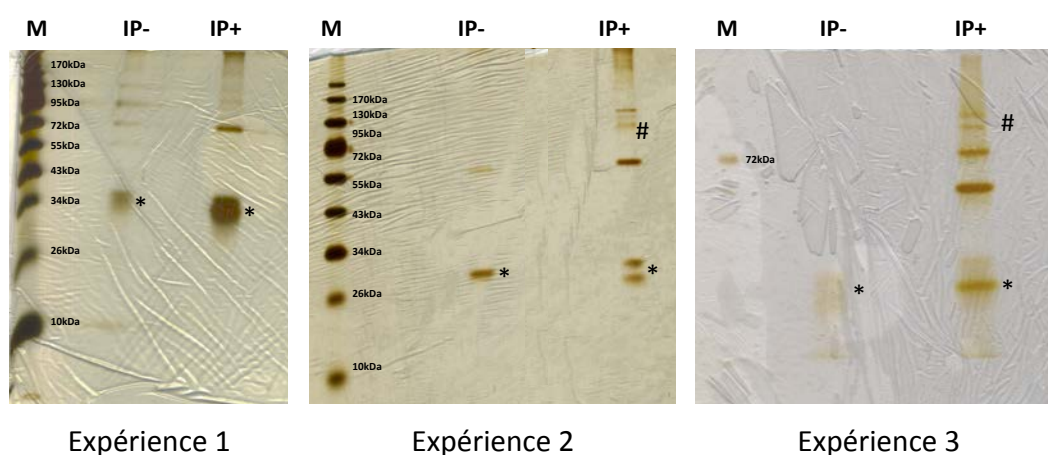
Le spectromètre de masse utilisé pour ces analyses est un MALDI-TOF de type Orbitrap (<http://3p5.medecine.univ-paris5.fr/spip.php?article1974>). L'ensemble des spectres obtenus a été analysé *in silico* à l'aide du logiciel Mascot.

## II. 3. Résultats

### II. 3. 1. Les données de la protéomique

La première expérience de protéomique a été réalisée à partir de 2,2 mg de protéines mitochondriales dans la condition avec (I+) ou sans (IP-) anticorps anti-OPA1 (Figure 23A). Après avoir analysé les échantillons par spectrométrie de masse, 32 protéines ont été identifiées comme étant des interactants potentiels d'OPA1. Les protéines trouvées dans la condition IP- et IP+ ont été retirées de l'analyse car elles sont considérées comme non-spécifiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines présentant des scores élevés et identifiées avec plus de 2 peptides. Ainsi, nous considérons pour cette première expérience 15 protéines partenaires d'OPA1. Pour affiner la recherche de partenaires et garantir la reproductibilité des résultats, nous avons réalisés l'expérience deux fois de plus. Dans les expériences 2 et 3, nous avons augmenté la quantité de protéines au départ pour récupérer un plus grand nombre de partenaires d'OPA1. Ainsi, nous avons identifié 14 et 25 nouveaux partenaires putatifs d'OPA1, respectivement. L'ensemble des protéines identifiées dans chaque expérience est détaillé dans la figure 24.

Lorsque que l'on regroupe les données obtenues dans les trois expériences, seulement 4 protéines sont détectées de façon reproductible, dont OPA1 (Figure 23B). Retrouver OPA1 avec un score (de 838 à 4265) et un nombre de peptides très élevés (de 27 à 110) dans chacune des expériences indique une bonne purification de la dynamine par immunoprécipitation. Les trois autres



### Figure 22 – Coloration des gels à l'argent

Les 3 gels représentent les 3 expériences de protéomique. Les surnageants des billes, qui contiennent (IP+) ou non (IP-) OPA1 et ses partenaires potentiels, ont été déposés dans des gels SDS-PAGE, colorés ensuite à l'argent. Dans la 1<sup>ère</sup> expérience, une trop grande quantité de marqueur (M) a été déposée et a fui sur les pistes voisines, notamment dans le puits IP-. Nous avons donc dilué le marqueur pour les deux autres expériences. Les bandes intenses que l'on observe à chaque expérience (\*) sont les protéines G des billes qui se détachent lors de la dénaturation des échantillons. Dans les expériences 2 et 3, les isoformes d'OPA1 sont visibles aux alentours de 95kDa (#).

**A**

Expérience	mg de protéines par point	Nombre de protéines identifiées par spectrométrie de masse	Nombre de protéines identifiées avec 2 peptides ou plus
1	2,2	32	15
2	3,8	20	14
3	5,5	54	25

**B**

	OPA1		Aconitase		Mitofiline		Hexokinase 1	
Expérience	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides
1	838	27	47	2	97	2	46	2
2	4265	110	145	4	551	13	223	5
3	3815	36	36	1	778	17	885	17

**C**

	MFN1		MFN2		HSP60		SAM50	
Expérience	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides
1	-	-	-	-	65	2	63	2
2	62	1	-	-	-	-	-	-
3	-	-	78	2	90	2	158	6

	G3PDH		ATAD3		ATP synthase $\beta$	
Expérience	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides
1	-	-	45	1	85	2
2	317	8	-	-	-	-
3	303	6	117	4	245	5

	VDAC1		VDAC2		VDAC3	
Expérience	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides	Score	Nb peptides
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	281	4	292	8	193	4

### Figure 23 – Récapitulatifs des 3 expériences de protéomique

(A) Tableau représentatif des 3 expériences réalisées avec la quantité de protéines analysées par point (pour IP+ et pour IP-), le nombre total de protéines identifiées par un spectromètre de masse MALDI-TOF de type Orbitrap (<http://3p5.medecine.univ-paris5.fr/spip.php?article1974>) et le nombre de protéines qui ont été identifiées avec 2 peptides ou plus lors de l'analyse, avec un score supérieur à 25. (B) Tableau récapitulatif des 3 partenaires potentiels d'OPA1 identifiés dans les 3 expériences de protéomique indépendantes. (C) Tableau récapitulatif des protéines retrouvées dans la littérature et celles qui ont été identifiées par 2 des 3 expériences de protéomique.



Protéines	Masse moléculaire	n	Localisation	Références
Aconitase	86121	1, 2 et 3	Matrice mitochondriale	Matasova LV and Popova TN. et al., 2008 ; Gruer MJ et al., 1997
Mitofiline	67477	1, 2 et 3	MIM	Zerbes RM. et al., 2012
Hexokinase 1	103540	1, 2 et 3	MEM, Cytoplasme	Schindler A. et al., 2013
HSP60	61088	1 et 3	Matrice mitochondriale	Cappello F. et al., 2008
SAM50	52384	1 et 3	MEM	Zeth K. et al., 2010
G3PDH	81549	2 et 3	MIM	Mandal MK. et al., 2011
ATP synthase su beta	56318	1 et 3	MIM	Jonckheere Al. Et al., 2012
ATAD3	66889	1 et 3	MIM	Shuijie L. et al., 2011
MAP1B	270532	1 et 3	Cytoplasme	Halpain S. et al., 2006
Neuromoduline	23703	1 et 3	Cytoplasme	Huang C. et al., 2013
DDX46	117826	1 et 3	Noyau, Cytoplasme	Hozumi S. et al., 2012
Histone H1.2	21974	1 et 2	Noyau	Harshman SW. Et al., 2013
Phosphate carrier protein	39876	1	MIM	Palmieri F. et al., 2013 ; Gutierrez-Aguilar M. et al., 2013
HSP90 beta	83571	1	Cytoplasme	Eckl JM. And Richter K. et al., 2013
T-complex protein 1 subunit alpha	60835	1	Cytoplasme	Yebenes H. et al., 2011
Spectrin alpha chain	285261	1	Cytoplasme	Salomao M. et al., 2005
LSAMP	37814	1	Membrane plasmique	Qiu S. et al., 2010
RUFY3	53158	1	Inconnue	Yoshida H. et al., 2010
Tubulin alpha 1B chain	50804	1	Cytoplasme	-
Histone H3.1	15509	1	Noyau	Harshman SW. Et al., 2013
Syntaxin-binding protein 1	67925	1	Membrane plasmique, Cytoplasme	jahn R. et al., 2012
IgG 1 chain C	36493	1	-	-
14 3 3 protein eta	28365	1	Cytoplasme	Ubl A. et al., 2002
Cryptochrome 1	66930	1	Noyau, mitochondrie	-
Creatine kinase B-type	42983	1	Cytoplasme	Flint Beal M. et al., 2011
Translational endoplasmic reticulum ATPase	89977	1	RE	Rumpf S. et al., 2011
Mitofusine 1	84649	2	MEM	Chan DC. Et al., 2012

**Figure 24 – Protéines identifiées dans les différentes analyses protéomiques**

Les protéines identifiées ont été retrouvées dans la 1<sup>ère</sup>, la 2<sup>ème</sup> et/ou la 3<sup>ème</sup> expérience de protéomique (n). Pour être validées, les protéines ont été identifiées à l'aide d'au moins un peptide et avec un score minimum de 25.

Protéines	Masse moléculaire	n	Localisation	Références
Malate déshydrogénase	36117	3	Matrice mitochondriale	Edwards CB. Et al., 2013
Complexe I su NDUS1 75kDa	80331	3	MIM	Koopman WJH. Et al., 2013
Complexe III Core 1	53500	3	MIM	Koopman WJH. Et al., 2013
Complexe IV COX2	26096	3	MIM	Koopman WJH. Et al., 2013
Complexe V ATP synthase su gamma	30229	3	MIM	Jonckheere Al. Et al., 2012
Complexe V ATP synthase su delta	17584	3	MIM	Jonckheere Al. Et al., 2012
Complexe V ATP synthase su O	23440	3	MIM	Jonckheere Al. Et al., 2012
NADH-cytochrome b5 reductase	34381	3	Mitochondrie	Koopman WJH. Et al., 2013
ADP/ATP translocase 2	33108	3	MIM	Palmieri F. et al., 2013 ; Gutierrez-Aguilar M. et al., 2013
Tricarboxylate transport protein	34156	3	MIM	Palmieri F. et al., 2013 ; Gutierrez-Aguilar M. et al., 2013
Mitochondrial glutamate carrier 2	34775	3	MIM	Palmieri F. et al., 2013 ; Gutierrez-Aguilar M. et al., 2013
Solute carrier family 25 member 46	46580	3	MIM	Palmieri F. et al., 2013 ; Gutierrez-Aguilar M. et al., 2013
Prohibitine	29859	3	MIM	Mishra S. et al., 2010
Prohibitine 2	33292	3	MIM	Mishra S. et al., 2010
VDAC1	30851	3	MEM	Colombini M. et al., 2011
VDAC2	32353	3	MEM	Colombini M. et al., 2011
VDAC3	31178	3	MEM	Colombini M. et al., 2011
TOM70	68143	3	MEM	Rapaport D. et al., 2005
Mitofusine 2	86809	3	MEM	Chan DC. Et al., 2012
Mitochondrial Fission Factor	24955	3	MEM	Chan DC. Et al., 2012
MIRO2	70250	3	MEM	Niescier RF. et al., 2013
Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5	32269	3	MEM	Wang Z. et al., 2012
HSDL1	37226	3	Mitochondrie	Meier M. et al., 2008
LRPPRC	157808	3	Mitochondrie	Mourier A. et al., 2014
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	71533	3	Cytoplasme	Kuta A et al., 2010
RAB2A	23692	3	RE/Golgi	Villarroel-Campos et al., 2014
ADP-ribosylation factor 1	20741	3	Cytoplasme, golgi	Bui QT. Et al., 2009
ADP-ribosylation factor 4	20498	3	Cytoplasme	Bui QT. Et al., 2009
CEND1	15091	3	Mitochondrie	Politis P. et al., 2007
CDC5L	92389	3	Noyau, Cytoplasme	Zhang N. et al., 2009
Stomatin-like protein 2	38504	3	Membrane plasmique	Lapatsina L. et al., 2012
Synapsine 1	74114	3	Cytoplasme	Yamagata Y., 2003
Brain acid soluble protein 1	21777	3	Noyau, membrane plasmique, cytoplasme	Mosevitsky MI. Et al., 2005
Nucléoside diphosphate kinase A	17296	3	Noyau, Cytoplasme	Boissan M. and Lacombe ML., 2011
Sideroflexine 1	35808	3	Membrane plasmique	Yoshikumi Y. et al., 2005
Sideroflexine 3	35696	3	Mitochondrie	Yoshikumi Y. et al., 2005
Armadillo repeat-containing protein 10	33743	3	MEM	Lopez-Doménech G. et al., 2011
Hemoglobin subunit beta 1	16083	3	Extracellulaire	-
SLC3A2	58150	3	Membrane plasmique	Feral C. et al., 2004
FAM136A	16128	3	Noyau	-
CCDC127	30622	3	Inconnue	-

protéines identifiées sont l'Aconitase, la Mitofiline et l'Hexokinase 1. Les scores et les nombres de peptides sont élevés dans chacune des expériences et pour ces trois partenaires potentiels. Cette approche de protéomique nous a permis d'identifier des partenaires d'OPA1 qui n'ont jamais encore été décrits dans la littérature, l'Aconitase et l'Hexokinase. La Mitofiline a déjà été identifiée comme étant un interactant d'OPA1, par une technique de co-immunoprécipitation dans les cellules HeLa (Darshi M. 2011).

Dans nos conditions, les Mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) ont également été détectées, ces protéines ayant déjà été décrites comme partenaires d'OPA1 dans des cellules HeLa (Guillery O. et al 2008). MFN1 a été identifié dans la deuxième expérience (score : 62, peptides : 1) et MFN2 dans la troisième (score : 78, peptides : 2) (Figure 23C).

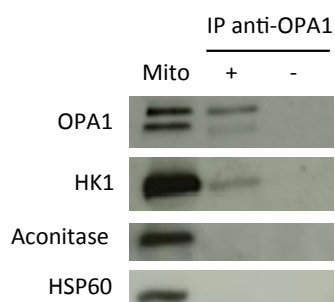
Nous avons également identifié 9 partenaires putatifs d'OPA1 dans deux des 3 expériences. Cinq d'entre elles sont localisées dans différents compartiments de la mitochondrie : HSP60 est matricielle, SAM50 est à la membrane externe et G3PDH, ATAD3 et la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase sont, comme OPA1, à la membrane interne (Figure 23C).

Enfin, nous avons identifié de nombreux candidats dans chacune des expériences, particulièrement dans la 3<sup>ème</sup> (Figure 24). Nous pouvons suggérer que le nombre important de partenaires identifiés peut être corrélé avec une quantité élevée de protéines immunoprécipitées (5,5 mg) dans cette expérience.

### **II. 3. 2. La validation des candidats obtenus**

Les résultats obtenus concernant la validation des partenaires candidats d'OPA1 sont encore préliminaires. Nous avons pour objectif de commencer la validation par des expériences de co-immunoprécipitation, réalisées dans les mêmes conditions que l'approche de protéomique. Dans un premier temps, nous avons choisi d'analyser l'interaction d'OPA1 avec l'Hexokinase 1 (HK1).

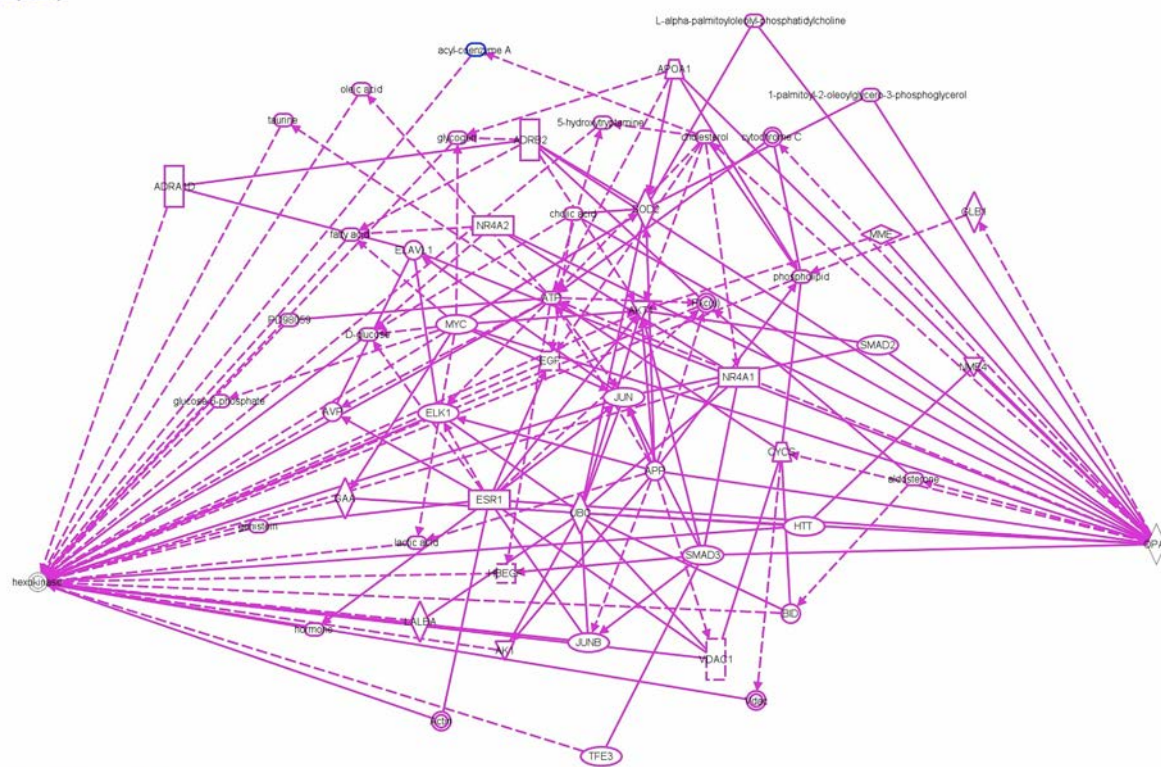
Après avoir réalisé des immunoprécipitations d'OPA1 à partir d'enrichissement mitochondriaux (1,5 mg de protéines), nous avons détecté de manière reproductible l'Hexokinase 1 (n=3), ce qui constitue une première étape de validation « d'interaction » entre ces deux protéines (Figure 25). Nous avons également fait un test d'immunoprécipitation d'OPA1 en révélant par immunoblot l'aconitase et HSP60 (identifié dans 2 des 3 expériences de protéomique). Nous ne révélons pas la présence de ces deux protéines dans l'échantillon. Nous envisageons donc d'augmenter la quantité de protéines à immunoprécipiter pour pouvoir détecter des interactions potentielles, car l'aconitase et HSP60 sont moins abondantes que l'HK1 dans les enrichissements mitochondriaux (puits Mito).



**Figure 25 – Immunopr  cipitation d’OPA1**

Apr  s immunopr  cipitation d’OPA1 (anticorps anti-OPA1)    partir de 1,5mg de prot  ines mitochondriales, r  v  lation par immunoblot des partenaires potentiels identifi  s dans les 3 exp  riences de prot  omique, comme l’Hexokinase 1 (HK1) (n=3) et l’aconitase (n=1), et dans 2 des 3 exp  riences, comme HSP60 (n=1).

New My Pathway 1



**Figure 26 – Analyse IPA (Ingenuity Pathway Analysis) entre OPA1 et l’Hexokinase 1**

Pour replacer OPA1 et à l'HK1 dans un contexte cellulaire intégré, nous avons réalisé une analyse IPA (Ingenuity Pathway Analysis) (Figure 26). Dans cette analyse, nous ne retrouvons pas d'autres protéines que nous avons identifiées dans les 3 expériences de protéomique, excepté la protéine VDAC1 (expérience 3) (Figure 23C).

## II. 4. Conclusion

La caractérisation des interactants d'OPA1 dans des neurones en culture primaire permet d'ouvrir de nombreuses pistes d'études des fonctions et des dysfonctions de la dynamine. Nous avons pu retrouver quelques protéines déjà connues pour interagir avec la dynamine comme les Mitofusines (Guillery et al. 2008) et la Mitofiline (Darshi et al. 2011). Les protéines identifiées qui n'ont pas encore été décrites dans la littérature, comme l'aconitase et l'Hexokinase 1 (HK1), identifiées dans les 3 expériences de protéomique, nous permettent de proposer de nouvelles perspectives (confère discussion générale) et de mesurer l'implication d'OPA1 dans de nombreuses fonctions cellulaires.

Nous souhaitons par la suite valider les interactions des 3 partenaires identifiés 3 fois, l'aconitase, la Mitofiline et l'HK1, avec OPA1 par des approches de co-immunoprécipitations et par immunocytofluorescence à l'aide de la technique « proximity ligation assay » (Barros et al. 2014; Zatloukal et al. 2014) qui permet de travailler avec les protéines endogènes et sur des échantillons en faible quantité. Nous pourrions par la suite poser ces questions également dans des fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1.

Pour les partenaires qui seraient validés, nous envisageons de déterminer plus précisément si ce sont des interactions directes, voire si tel est le cas d'identifier les domaines d'interactions protéine-protéine impliqués, par l'utilisation de protéines mutées dans des domaines ciblés. Ensuite, nous sélectionnerons des candidats identifiés dans une ou deux expériences de protéomique et poursuivrons les étapes de validations énoncées ci-dessus.

Enfin, nous envisageons de nous concentrer sur un ou deux partenaires jugés intéressants afin de préciser l'intérêt fonctionnel de cette interaction. La perte de fonction d'un des deux partenaires influence-t-elle l'activité et/ou la stabilité de l'autre protéine *in vitro* ? Par exemple, nous pourrions introduire une forme pathogène d'OPA1 (mutation G300E humaine) dans des neurones à l'aide d'un vecteur lentiviral que nous possédons au laboratoire, et vérifier si l'interaction avec un

partenaire x est maintenue, si oui, est-elle fonctionnelle ? Si non, quels sont les mécanismes sous-jacents qui perturberaient cette interaction ?

Ce travail d'identification de l'interactome d'OPA1 ouvre donc de nouvelles pistes d'étude des fonctions de la dynamine et des perspectives de travail pour appréhender ses dysfonctions, impliquées dans la pathogenèse de l'ADOA-1.

### III. Influence d'OPA1 sur la morphologie des mitochondries et sur la maturation neuronale

#### III. 1. Contexte et objectifs

L'implication de la dynamique mitochondriale dans la maturation et le fonctionnement neuronal a largement été décrite dans la littérature (Chang and Blackstone 2010; Chen and Chan 2005, Chen and Chan 2010; Girard et al. 2012; Kuznetsov et al. 2009). Des mutations des acteurs qui contrôlent ce mécanisme, comme MFN2 et OPA1, aboutissent à des pathologies telles que Charcot-Marie-Tooth type 2A et l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (Landes et al. 2010; Pich et al. 2005). Pour comprendre l'étiologie de ces maladies et l'importance de la dynamique mitochondriale sur le fonctionnellement neuronal, des nombreuses études ont été réalisées dans des modèles cellulaires et animaux (Alavi et al. 2007; Chen and Chan 2010; Chen et al. 2007; Chen et al. 2003; Ishihara et al. 2009; Wakabayashi et al. 2009). De manière intéressante, des lignées de cellules souches, dérivées d'un modèle murin  $DRP1^{-/-}$  (Ishihara et al. 2009) présentent des mitochondries agrégées qui possèdent une morphologie tubulaire avec des crêtes mitochondriales qui semblent intactes. De plus, les souris dépourvues de  $DRP1$  présentent une élévation de l'apoptose dans le cerveau en formation, une diminution du nombre de synapses et des neurites, mais pas d'atteinte dans les autres tissus. Ce modèle murin a donc permis de mettre en évidence le rôle majeur de  $DRP1$  dans le développement du tissu nerveux.

A ce jour, de nombreux travaux ont été réalisés dans des modèles cellulaires et animaux de l'ADOA-1 pour comprendre l'étiologie de la pathologie (Amati-Bonneau et al. 2009; Landes et al. 2010; Olichon et al. 2006) mais aucune piste concernant l'implication d'OPA1 sur des effets précoces, comme la maturation neuronale, n'a été étudiée. Ainsi, le travail d'Ambre Bertholet, auquel j'ai collaboré pendant ma thèse, s'est inscrit dans un objectif global visant à déterminer l'impact de la protéine OPA1 sur la maturation neuronale *ex vivo*. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Brain* en 2013 (Bertholet et al. 2013).

#### III. 2. Modèle expérimental et méthodologie

L'équipe a choisi de travailler sur les conséquences de la perte de fonction de la protéine OPA1 sur un modèle de neurones corticaux en culture primaire, prélevés au stade embryonnaire E17 chez le rat; modèle développé au laboratoire par Ambre Bertholet (protocole dans la partie

matériels et méthodes). Ces cellules sont capables de progresser d'un état immature à un état mature *ex vivo*.

### III. 3. Résultats

#### III. 3. 1. Caractérisation de la morphologie des mitochondries au cours de la maturation neuronale

Le réseau mitochondrial au cours de la maturation neuronale *ex vivo* apparaît majoritairement filamenteux, jusqu'au 12<sup>ème</sup> jours de culture, avec un pic d'hyperfilamentation transitoire à DIV6. De plus, la quantité de la forme longue d'OPA1 augmente au cours de la culture, alors que l'expression de MFN1 diminue à partir de DIV6. Ainsi, le processus d'hyperfilamentation transitoire au 6<sup>ème</sup> jour de culture semble être régulé par le ratio OPA1/MFN1. Le profil d'expression des différents acteurs de la dynamique (DRP1, MFN1, MFN2, OPA1) *ex vivo* est comparable aux variations observées au cours du développement (stades E17, E20, P1 et adulte).

#### III. 3. 2. Caractérisation de l'activité des mitochondries au cours de la maturation neuronale

L'activité de la chaîne respiratoire a été évaluée de manière indirecte par la mesure du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde JC-1 (DIV4, DIV6 et DIV8). Le potentiel de membrane est augmenté transitoirement au 6<sup>ème</sup> jour de culture, phénomène corrélé avec l'hyperfilamentation des mitochondries. De plus, le taux intracellulaire total d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAO) augmente de manière transitoire à DIV6. En présence de Trolox, un agent antioxydant, le taux d'EAO est alors fortement diminué à DIV6 et le réseau mitochondrial reste fragmenté. Le caractère transitoire de l'augmentation des EAO au cours de la maturation neuronale suggère qu'il pourrait s'agir d'une voie de signalisation cellulaire, en aval de l'hyperfilamentation.

Un des acteurs privilégiés reliant la maturation neuronale à la régulation du niveau des EAO est le facteur de transcription NRF2 (Kosaka et al., 2010; Zhao et al., 2009a). J'ai analysé l'implication de NRF2 en réalisant des immunocytofluorescences dirigées contre la protéine à DIV4, DIV6 et DIV8. A l'aide du logiciel Image J et des micrographies obtenue au microscope à épifluorescence, j'ai déterminé le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire de NRF2, signe de son activation. Nous avons dans ce contexte, observé une augmentation transitoire significative du nombre de cellules présentant une translocation nucléaire de NRF2 à DIV6.



### III. 3. 3. Effets de la perte de fonction d'OPA1 sur la morphologie et le fonctionnement des mitochondries dans les neurones

Comme précédemment décrit, par une stratégie d'interférence ARN, le niveau d'expression de la protéine OPA1 dans les neurones est diminué d'environ 60%, mimant un processus d'haploinsuffisance. La diminution d'OPA1 ne perturbe pas la viabilité cellulaire *ex vivo*. Comme il a déjà été montré par l'équipe dans des cellules HeLa (Olichon et al. 2003), la diminution d'OPA1 induit une fragmentation du réseau mitochondrial dans des neurones à DIV6. De plus, la biomasse mitochondriale et le nombre de mitochondrie ne sont pas affectés par la perte d'OPA1, bien qu'il y ait une légère augmentation du nombre de mitochondrie dans la zone proche du soma (proximale). Toutefois, la masse de l'organite est plus faible dans les neurones invalidés pour OPA1, quelle que soit la zone analysée (proximale ou distale).

Comme décrit dans la première partie des résultats, cette perturbation de la distribution des mitochondries s'accompagne d'une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial.

### III. 3. 4. Effets de la perte de fonction d'OPA1 sur la maturation neuronale

La quantité de marqueurs pré- et post-synaptiques et le nombre de synapses sont significativement diminués dans les neurones invalidés pour OPA1, dès le 6<sup>ème</sup> jour de culture, défauts également détectés au 9<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour de culture des neurones *ex vivo*.

L'arborisation dendritique déterminée par la longueur des embranchements primaires et secondaires, n'est pas affectée par la perte d'OPA1 au 6<sup>ème</sup> jour de culture mais le devient à partir du 9<sup>ème</sup> jour de culture, jusqu'à DIV12 : les embranchements primaires et secondaires sont plus courts.

Ainsi, la perte d'OPA1 induit une perturbation de la maturation neuronale par un retard de croissance dendritique et un défaut de synaptogenèse.

## **III. 4. Conclusion**

Nous avons démontré que l'inactivation de la protéine OPA1 perturbe la morphologie et le fonctionnement des mitochondries, et affecte la maturation des neurones. Ces travaux confortent l'idée que la dynamique mitochondriale, processus ubiquitaire, joue un rôle crucial dans la mise en place et le fonctionnement des neurones. En effet, la perturbation de ce processus engendre majoritairement des atteintes neurologiques (C.-R. Chang and Blackstone 2010; H. Chen and Chan

2005, 2010; Girard et al. 2012; Kuznetsov et al. 2009).

Quel que soit le stade de maturation, les mitochondries sont globalement filamenteuses et colonisent tous les compartiments des neurones corticaux en culture primaire. Nos travaux ont mis en évidence une hyperfilamentation transitoire des mitochondries au cours de la maturation des neurones corticaux au 6<sup>ème</sup> jour de culture. Ce processus s'accompagne d'une augmentation du potentiel de membrane, pouvant refléter une activité plus importante de la chaîne respiratoire. De plus, le changement de morphologie mitochondriale observé est corrélé à une élévation transitoire du taux intracellulaire d'EAO et une translocation au noyau du facteur de transcription NRF2. L'augmentation du taux d'EAO pourrait être une conséquence de l'hyperfilamentation et pourrait engendrer l'activation de la voie de signalisation de NRF2 et donc la maturation des neurones par l'induction de cibles qui restent à caractériser.

L'extinction de la protéine OPA1 dans les neurones corticaux provoque la fragmentation des mitochondries. Les mitochondries fragmentées sont distribuées dans tous les compartiments des neurones transfectés par les siOPA1, mais la masse mitochondriale est diminuée dans les dendrites et dans les axones (Arnaud Bonnafoux). La diminution d'expression de la dynamine OPA1 entraîne également une perturbation de la fonctionnalité des mitochondries (confer partie I des résultats). Ceci pourrait être responsable des problèmes de maturation neuronale constatés dans notre modèle. En effet, nous avons pu démontrer l'impact de la protéine OPA1 sur la maturation neuronale et notamment la synaptogenèse car le nombre de synapses est clairement affecté suite à la diminution d'OPA1.

La compréhension des fonctions d'OPA1 dans la maturation des neurones pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'ADOA-1 mais aussi d'autres maladies neurodégénératives en général.

## OPA1 loss of function affects *in vitro* neuronal maturation

Ambre M. Bertholet,<sup>1</sup> Aurélie M.E. Millet,<sup>1</sup> Oriane Guillermin,<sup>1</sup> Marlène Daloyau,<sup>1</sup> Noémie Davezac,<sup>1</sup> Marie-Christine Miquel<sup>1,2,\*</sup> and Pascale Belenguer<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse, Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547/Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>2</sup> UPMC Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Pascale Belenguer  
 CNRS UMR 5547/Université Paul Sabatier,  
 Bât 4R3BB3,  
 118 route de Narbonne,  
 31062 Toulouse,  
 France  
 E-mail: pascale.belenguer@univ-tlse3.fr

Mitochondrial dynamics control the organelle's morphology, with fusion leading to the formation of elongated tubules and fission leading to isolated puncta, as well as mitochondrial functions. Recent reports have shown that disruptions of mitochondrial dynamics contribute to neurodegenerative diseases. Mutations of the inner membrane GTPase OPA1 are responsible for type 1 dominant optic atrophy, by mechanisms not fully understood. We show here that in rodent cortical primary neurons, downregulation of the OPA1 protein leads to fragmented mitochondria that become less abundant along the dendrites. Furthermore, this inhibition results in reduced expression of mitochondrial respiratory complexes as well as mitochondrial DNA, decreased mitochondrial membrane potential, and diminished reactive oxygen species levels. The onset of synaptogenesis was markedly impaired through reductions in pre- and postsynaptic structural protein expression and synapse numbers without first affecting the dendritic arborization. With longer time in culture, OPA1 extinction led to a major restriction of dendritic growth, together with reduction of synaptic proteins. Furthermore, in maturing neurons we observed a transitory increase in mitochondrial filament length, associated with marked changes in the expression levels of OPA1, which occurred at the onset of synaptogenesis simultaneously with transitory increase in reactive oxygen species levels and NRF2/NFE2L2 nuclear translocation. This observation suggests that mitochondrial hyperfilamentation acts upstream of a reactive oxygen species-dependent NRF2 transcriptional activity, possibly impacting neuronal maturation, such a process being impaired by insufficient amount of OPA1. Our findings suggest a new role for OPA1 in synaptic maturation and dendritic growth through maintenance of proper mitochondrial oxidative metabolism and distribution, highlighting the role of mitochondrial dynamics in neuronal functioning and providing insights into dominant optic atrophy pathogenesis, as OPA1 loss affecting neuronal maturation could lead to early synaptic dysfunction.

**Keywords:** OPA1; DOA; synaptic maturation; mitochondrial dynamics; ROS

**Abbreviation:** DOA = dominant optic atrophy

Received July 17, 2012. Revised December 21, 2012. Accepted January 25, 2013. Advance Access publication March 29, 2013

© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

## Introduction

The highly specialized nature and architecture of neurons presents a challenge for mitochondria, which must furnish energy and buffer calcium in remote parts of the cell and in specialized domains. Furthermore, the organelle must adapt to variations in neurotransmission activity. The importance of mitochondria in neurons is emphasized by the impaired mitochondrial function that occurs in numerous neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease (reviewed in Schon and Przedborski, 2011). Additionally, recent reports have suggested that not only perturbation of mitochondrial metabolism but also disruptions of mitochondrial dynamics, which control mitochondrial morphology, contribute to neurodegenerative diseases (Schon and Przedborski, 2011).

Mitochondrial morphology varies according to cell type and cellular context, ranging from an interconnected filamentous network to isolated spheres, depending both on the cytoskeleton, which controls mitochondrial distribution and motility (reviewed in Boldogh and Pon, 2007), and on recently discovered mitochondrial dynamics (reviewed in Westermann, 2010). This dynamic balance between fission and fusion of mitochondrial membranes depends on protein complexes conserved throughout evolution. Increasing fusion leads to interconnected mitochondrial filaments; increasing fission leads to isolated dot-like structures. Key proteins involved in fission are Dynamin-Related Protein 1 (DRP1), MFF1 and FIS1, while the mitofusins (MFN1 and MFN2) and OPA1 control fusion. The functional relevance of mitochondrial dynamics is emphasized both by its repercussions on such key processes as respiration, calcium homeostasis, reactive oxygen species production, apoptosis, and by its requirement during embryonic development (Westermann, 2010). Furthermore, while this process is ubiquitous, several data highlight the importance of mitochondrial dynamics in neurons. Conditional MFN2 and DRP1 knockouts in mice are indeed associated with defects in CNS neuronal development (Chen *et al.*, 2007; Ishihara *et al.*, 2009), and mutations of MFN2 and OPA1 are responsible for type 2 Charcot–Marie–Tooth peripheral neuropathy and type 1 dominant optic atrophy (DOA), respectively (Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2004).

Pathogenic OPA1 mutations account for ~60% of autosomal dominant optic atrophy, a common cause of inherited visual failure, with a frequency of 1:50 000 (reviewed in Amati-Bonneau *et al.*, 2009). OPA1 is an ubiquitously expressed GTPase that is present in mitochondria as long and short isoforms generated by limited intra-mitochondrial proteolysis (reviewed in Landes *et al.*, 2010). Both isoforms of OPA1 are localized in the intermembrane space and are primarily associated with the inner mitochondrial membrane. OPA1 plays a central role not only in the maintenance of mitochondrial morphology but also in protecting cells from apoptosis, the two functions being independent (Olichon *et al.*, 2003, 2007; Cipolat *et al.*, 2004; Frezza *et al.*, 2006). OPA1 was also recently found to be involved in mitochondrial DNA maintenance (Elachouri *et al.*, 2011). Most of the >200 different OPA1 mutations result in premature termination codons, with truncated messenger RNA that are unstable and degraded by nonsense-mediated messenger RNA degradation (Amati-Bonneau

*et al.*, 2009). The reduction in OPA1 protein levels is a major disease mechanism, and the importance of haploinsufficiency is further emphasized by rare families carrying a deletion of either the entire or most of the OPA1 open reading frame (Amati-Bonneau *et al.*, 2009). Although optic nerve degeneration remains the defining feature of DOA, up to 20% of patients with OPA1 mutations also develop additional extraocular neurological complications (DOA+ syndrome), including deafness, ataxia, myopathy, peripheral neuropathy and progressive external ophthalmoplegia (Yu-Wai-Man *et al.*, 2010). The extent to which inactivation of OPA1 functions contributes to DOA and DOA+ pathogenesis remains to be elucidated. Data on non-neuronal cell lines, such as HeLa cells, mouse embryonic fibroblasts and skin fibroblasts from patients with DOA or DOA+ suggest that impairment of mitochondrial morphology, functions and/or increased sensitivity to apoptosis could be involved (Landes *et al.*, 2010). Because haploinsufficiency is primarily responsible for DOA and as the effects of OPA1 inactivation are not restricted to retinal ganglionic cells, we addressed the question of the general impact of OPA1 inactivation in neurons by downregulating OPA1 in rat cortical neurons in primary culture.

We showed that downregulation of OPA1 leads to fragmented mitochondria that become less abundant along the dendrites. Furthermore, this inhibition results in reduced expression of mitochondrial respiratory complexes as well as mitochondrial DNA, decreased mitochondrial membrane potential, and diminished reactive oxygen species levels. Moreover, reduction of OPA1 protein leads to reduction of synaptic protein expression levels and synapse number, followed by drastic alterations of dendritic arborization. Altogether, these results suggest that lowering OPA1 protein levels, through alterations in oxidative metabolism exacerbated by a reduction in dendritic mitochondrial content, could primarily affect neuronal maturation leading to early neuronal dysfunctions. Interestingly, in maturing neurons we observed a transitory increase in mitochondrial filament length, associated with marked changes in the expression levels of OPA1, which occurred at the onset of synaptogenesis simultaneously to transitory increases in reactive oxygen species levels and NRF2/NFE2L2 nuclear translocation. This observation suggests that mitochondrial hyperfilamentation acts upstream of a reactive oxygen species-dependent NRF2 transcriptional activity, possibly impacting neuronal maturation, such a process being impaired by insufficient amount of OPA1.

## Materials and methods

### Primary culture and transfection

All animals ( $n = 50$ ) in this study were ethically maintained and used. Embryos ( $n = 400$ ) were removed at embryonic Day 17 from pregnant Wistar rats (Janvier) under intraperitoneal pentobarbitol (Sigma) anaesthesia. Cortices were dissected, enzymatically dissociated with papain (10 U/ml, Sigma), and plated on poly-D-lysine (0.1 mg/ml, Sigma) coated Petri dishes with or without glass cover-slips. For each experiment, cortices from 8 to 12 embryos per rat are mixed. Experiments were reproduced three to eight times.

Cultures were grown in Neurobasal® (Eurobio) supplemented with B27 (Invitrogen), 2 mM glutamine, and 0.1% penicillin and

streptomycin (Gibco), 250 U/ml amphotericin (Invitrogen), 1 mM lactic acid (Sigma) at a density of  $6 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$ .

Cells ( $5 \times 10^5$ ) were electroporated after dissociation using the Rat Neuron Nucleofector<sup>®</sup> Kit (AMAXA<sup>®</sup>, Lonza) using an optimized protocol for primary rat cortical neurons ([http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized\\_Protocol\\_101.pdf](http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_101.pdf)). Three micrograms of control luciferase-targeting (D-001210-02, control small interfering RNA) or OPA1-targeting (target sequence GAUUGUGCCUGACUUUAUA, small interfering RNA against OPA1) small interfering RNA (Dharmacon), with or without 3  $\mu\text{g}$  MitoDSRed2 plasmid (Clontech) were used.

Using vectors expressing fluorescent pan-cellular (GFP) or mitochondrial (MitoDSRed2) proteins, we estimated after 72 h the efficiency of electroporation to be  $37 \pm 3\%$  and  $36 \pm 4\%$ , respectively ( $n = 3$ , 300 cells per condition). However, the efficiency of electroporation of the small interfering RNA OPA1, which we estimated at 6 days *in vitro* using a functional criterion (mitochondrial fragmentation), is much higher i.e.  $\sim 60\%$  (Fig. 3C).

Viability of plated cortical cells was estimated using the Trypan blue exclusion assay. Neurons were incubated in the presence of 0.2% Trypan blue in PBS for 3 min. The number of viable cells, i.e. which exclude the dye, was estimated by counting under light microscope (Supplementary Fig. 1). Viability of untransfected cells was  $\sim 82\%$  ( $n = 3$ , 300 cells per condition) from 2 days *in vitro* to 12 days *in vitro* (Supplementary Fig. 1A). Viability of transfected cells at 2 days *in vitro* was  $81 \pm 2\%$  (Supplementary Fig. 1B) and was identical for control small interfering RNA and small interfering RNA against OPA1 until 12 days *in vitro* (Supplementary Fig. 1C) ( $n = 3$ , 300 cells per condition).

## Measurement of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential

Reactive oxygen species levels were measured using the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes). This dye passively diffuses into the cells, where its acetate groups are cleaved by intracellular esterases and its thiol-reactive chloromethyl group reacts with intracellular glutathione and other thiols. Subsequent oxidation yields a fluorescent adduct. Cortical cells were incubated (five dishes per condition,  $n = 5$  independent experiments) with CM-H<sub>2</sub>DCFDA at 4  $\mu\text{M}$  for 30 min at 37°C in growth medium. Cells were then washed in cold PBS and scraped in cold water to be disrupted. Reactive oxygen species levels were measured (490 nm excitation, 520 nm emission) using a Wallac spectrofluorimeter (Perkin Elmer). Levels of fluorescence were standardized to protein levels that were estimated using a Lowry-based colorimetric assay (DC protein assay, Bio-Rad).

Mitochondrial membrane potential was measured using the cationic, voltage-sensitive dye 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Invitrogen). The monomeric form of this dye has a green fluorescence, while at higher concentrations or potentials it forms red fluorescent J-aggregates. The ratio of red/green fluorescence is independent of mitochondrial shape, density or size, but depends on the membrane potential. Cortical cells were incubated (five dishes per condition,  $n = 5$  independent experiments) with JC-1 at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 20 min at 37°C in growth medium. Cells were then washed and scraped in cold PBS. Ratio of red fluorescence (488 nm excitation, 590 nm emission) to green fluorescence (488 nm excitation and 525 nm emission) were quantified using a Wallac spectrofluorimeter (Perkin Elmer).

## Immunocytochemistry

Cells were fixed with PBS containing 3.7% formaldehyde for 20 min, permeabilized for 15 min in PBS, 1% bovine serum albumin, 0.3% Triton<sup>™</sup> X-100 and blocked for 1 h in PBS containing 5% normal goat serum, 3% bovine serum albumin, 0.5% Tween 20. Alternatively, methanol fixation (10 min,  $-20^\circ\text{C}$ ) was performed prior to nuclear NRF2 detection. Polyclonal or monoclonal antibodies against Map2, Beta 3 tubulin (both 1/1000, Sigma), NRF2 (Santa Cruz, 1/50), synapsin (1/800, Synaptic Systems), synaptophysin (1/500, Abcam), PSD95 (1/800, Millipore), DNA (1/50, Progen) and all five mitochondrial respiratory complexes (MitoProfile<sup>®</sup> Total OXPHOS 1/50, MitoSciences), were incubated overnight at 4°C in blocking solution. Cells were then incubated with appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies (1/1000, Molecular Probes), labelled with 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst in PBS over 5 min, and mounted in Mowiol<sup>®</sup>. Immunolabelling was visualized under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i or SP2-Leica), and images were acquired using NIS-Element (Nikon Digital Sight DSU2 camera) or SP2-Leica software. Mitochondrial size was measured in the somatic/proximal part of dendrites using ImageJ software and confocal images ( $\times 63$ ) (average of 1500 mitochondria per 35 neurons per time point,  $n = 3$ ). Dendrite length, branching and number were measured for five to ten neurons per cover-slip (three cover-slips per condition, three to five independent experiments) using the NeuronJ add-on to ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and digitized images ( $\times 100$ ). Quantification of synaptic elements was automatically performed using the ImageJ software after intensity thresholding. Synapses were counted when pre- and post-synaptic markers co-localized ( $\times 100$ , 10 independent fields per well, three cover-slips per condition,  $n = 3$  independent experiments). Mitochondrial area and number were measured using the ImageJ software and confocal images ( $\times 63$ ) of 10 independent fields per cover-slip (three cover-slips per condition, total average of seven neurons,  $n = 4$  independent experiments). Quantification of mitochondrial DNA was automatically performed using the Velocity<sup>®</sup> 3D Image Analysis Software after intensity thresholding and elimination of nuclear fluorescence. Cytoplasmic fluorescent dots were counted as mitochondrial DNA when they co-localized with mitochondria ( $\times 100$ , eight independent fields per cover-slip, two cover-slips per condition, 18 neurons per condition,  $n = 3$  independent experiments).

## Immunoblot

In all experiments but those shown in Fig. 1, cells were scraped and suspended in Laemmli sample buffer and directly loaded on a gel (similar cell number). For Fig. 1 experiment, protein concentration was measured (Bio-Rad), after protein extraction in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 M NaCl, 5 mM EDTA and EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton<sup>™</sup> X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% NP40 and a cocktail of proteases inhibitors from Boehringer), and 50  $\mu\text{g}$  per time point (0 to 12 days *in vitro*) were loaded on gels. Proteins were subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After blocking in Tris-buffered saline with 0.2% Tween and 5% dry low-fat milk, membranes were treated with various primary antibodies [anti-actin (1/10 000, Chemicon), anti-DRP1 (1/200, BD Biosciences), anti-HSP60 (LK2, 1/200, Sigma), anti-MFN1 (1/50, gift from M. Rojo, Bordeaux), anti-MFN2 (1/200, Abnova), anti-OPA1 (1/300, BD Biosciences), anti-PSD95 (1/800, Millipore), anti-synapsin (1/800, Synaptic Systems), anti-synaptophysin (1/500, Abcam), anti-MFF1 (1/500, Abcam)] overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies directed against subunits of the five respiratory complexes are listed in Supplementary Table 1. After enhanced chemiluminescent detection of

horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies (1/10 000, Abcam), scanned photographic films were analysed using ImageJ software.

## Statistical analysis

Most of the experiments were statistically treated with paired student's *t*-test because of the systematic comparison between control small interfering RNA and small interfering RNA against OPA1-treated cells (Figs 2–8, Supplementary Figs 4C, 6 and 7). The ratio of long over short mitochondria (Fig. 1C), the distribution (area and number) of mitochondria in control small interfering RNA or in small interfering RNA against OPA1 (Supplementary Fig. 8) were investigated using an ANOVA to compare all the groups (Bartlett's test for equal variance and Newman Keuls Multiple comparison post-test). Analysis of MFN1, MFN2, DRP1, MFF1, actin and HSP60 quantities over time in culture (Fig. 1A and E and Supplementary Fig. 4A and B) were carried out with a non-parametric test (Kruskal-Wallis and a Dunn's multiple comparison post-test). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

## Results

### Mitochondrial dynamics is differentially regulated during neuronal maturation

To unravel the impact of OPA1 inactivation in neuronal cells, we used embryonic rat cortical neurons grown in primary culture, a well-known *in vitro* model for neuronal maturation (Brewer, 1995). Neuronal growth was assessed by MAP2 (Supplementary Fig. 2A) and beta 3 tubulin immunostaining (not shown), and synaptic maturation was visualized by immunodetection of the presynaptic vesicle protein synaptophysin. Synaptophysin expression started after 4 days *in vitro* and accumulated until 12 days *in vitro*, as detected *in situ* (Supplementary Fig. 2B) or by western blot (Fig. 1A).

Before manipulating OPA1, we first evaluated the mitochondrial morphology of rat cortical neurons. Confocal microscopy images of the neuronal mitochondrial network throughout maturation were obtained after immunostaining of the mitochondrial respiratory chain complexes (Fig. 1B). At all days *in vitro*, the neuronal mitochondrion was filamentous, with a mean mitochondrial length of ~1.2 µm and ~27% of round mitochondria with circularity (biggest length/smallest length) of 1. After morphometric analysis, we grouped mitochondria in one of two classes: short (0.3 to 2 µm) or long (2 to 10 µm), as a function of time in culture. The ratio of long versus short mitochondria was roughly constant during the first days *in vitro*, but exhibited a transitory 3-fold increase at 6 days *in vitro* owing to an increase in the long population, after which the ratio rapidly returned to earlier levels (Fig. 1C).

We next characterized the expression of OPA1 during neuronal maturation by western blot (Fig. 1A). The OPA1 protein is composed of five isoforms ('a'–'e') (Supplementary Fig. 3); only the main ones (i.e. the long form 'b' and the short form 'd') are detected here. Interestingly, the ratio of these OPA1 'b'/'d' isoforms reveals a continuous increase from 2 to 12 days *in vitro* due to a higher expression of OPA1 long form (Fig. 1D). We also measured

the expression of other key proteins involved in mitochondrial dynamics. Whereas MFN2 protein levels remained constant, those of MFN1 decreased significantly from 6 to 12 days *in vitro* (Fig. 1E). Furthermore, although two isoforms of DRP1 were detected in dissociated neurons before plating (0 days *in vitro*), only the longer isoform was present later on (Fig. 1A). The levels of MFF1 did not significantly change during *in vitro* neuronal maturation (Supplementary Fig. 4A), as those of mitochondrial protein HSP60 (used as loading control) and actin (Supplementary Fig. 4B). Similar changes in the expression of key regulators of mitochondrial dynamics were observed *in vivo* during cortical development, as assessed by western blots from embryonic Days 17 and 20 embryos, as well as from post-natal or adult cortices (Fig. 1F).

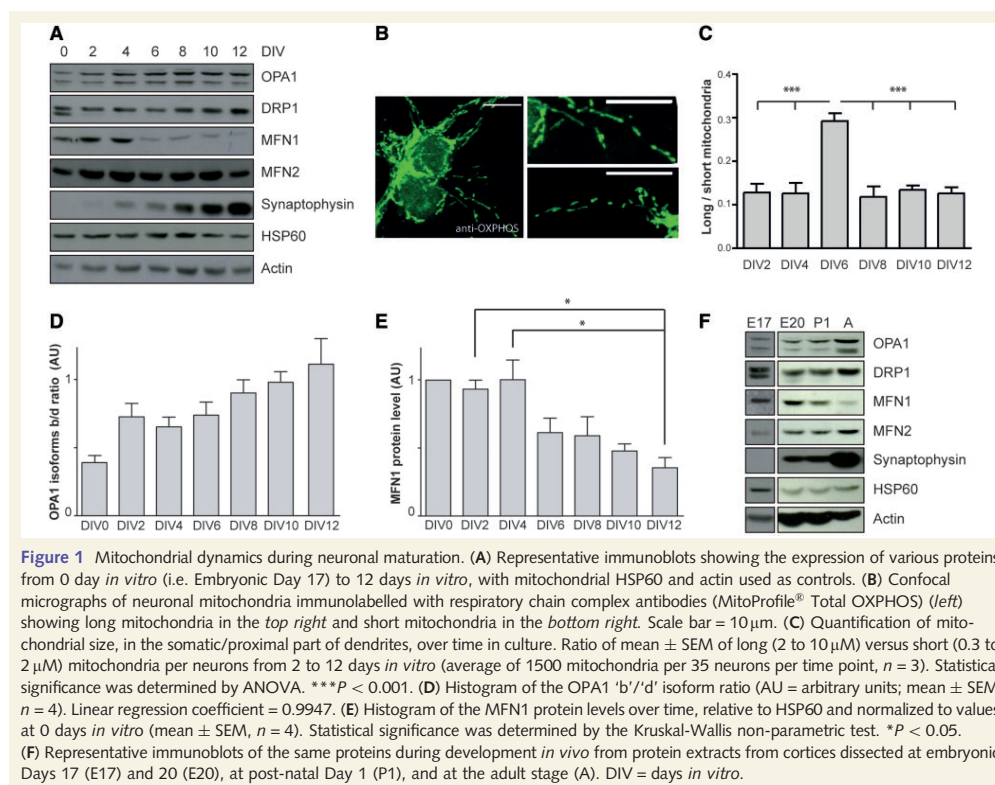
### Transitory increases in mitochondrial potential, reactive oxygen species and NRF2 nuclear translocation during neuronal maturation

Because mitochondrial morphology changes can affect the functions of the organelle, we followed the evolution of two main parameters, mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species levels. Indeed, the transitory mitochondrial hyperfusion observed at 6 days *in vitro* (Fig. 1C) was accompanied by a statistically significant transient  $63 \pm 22\%$  increase in mitochondrial membrane potential, measured by spectrofluorometry through the red/green fluorescence ratio of the voltage-sensitive dye JC-1 (Fig. 2A). Similarly, we detected a  $42 \pm 9\%$  augmentation of reactive oxygen species levels specifically at 6 days *in vitro*, as assessed by spectrofluorometry using CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Fig. 2B). Interestingly, we observed a similar time course for the nuclear translocation of the redox-sensitive NRF2 transcription factor (Supplementary Fig. 5), with a 2-fold increase at 6 days *in vitro* (Fig. 2C). To analyse the causal link between reactive oxygen species levels and hyperfilamentation, we pretreated the cells with the antioxidant Trolox<sup>TM</sup>. Whereas this treatment reduced reactive oxygen species levels by 50% (Fig. 2D), it did not affect mitochondrial morphology at 6 days *in vitro*, the organelles remaining hyperfilamentous (Fig. 2E).

### OPA1 downregulation alters mitochondrial morphology in neurons

To investigate the impact of OPA1 inactivation in neurons, we downregulated the expression of the profusion protein by RNA interference. Cortical neurons were transfected with small interfering RNA against OPA1 or control small interfering RNA before plating.

At 6 days *in vitro*, western blot analysis using anti-OPA1 antibodies revealed an effective knockdown of OPA1 expression ( $61 \pm 8\%$ , Fig. 3A). The effect of small interfering RNA against OPA1 downregulation on mitochondrial morphology was analysed under a fluorescent microscope by counting the number of MAP2-labelled neurons with fragmented DsRed2-labelled mitochondria at 6 days *in vitro* (Fig. 3B). Neurons were considered



bearing a mitochondrial fragmented phenotype when they contained a majority of round and very short mitochondria (Fig. 3B). As expected, OPA1 downregulation led to a 6.5-fold increase in neurons with fragmented mitochondria, reaching  $72 \pm 9\%$  of the total population (Fig. 3C). Morphometric analysis of mitochondria length in control small interfering RNA and small interfering RNA against OPA1 transfected neurons at 6 days *in vitro* showed that the mean mitochondria size decreased by 2-fold (Fig. 3D) and the percentage of round mitochondria (circularity = 1) increased by 2-fold upon OPA1 downregulation (Fig. 3E). No impact on OPA1 downregulation was observed on cell viability (Supplementary Fig. 1C), or on the spontaneous apoptotic neuronal death rate (Supplementary Fig. 1D).

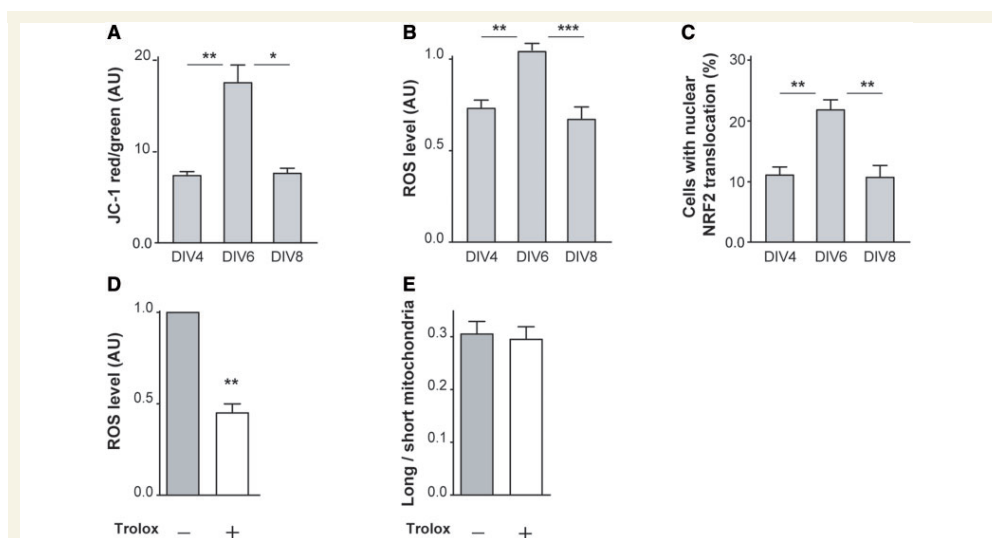
### OPA1 downregulation alters neuronal maturation

We analysed the possible consequences of the perturbation of mitochondrial morphology induced by OPA1 downregulation on the overall neuronal morphology, illustrated here by Map2 immunostaining (Fig. 3B). Morphometric analysis demonstrated that OPA1 downregulation did not modify dendritic arborization, in

terms of either primary and secondary dendrite length or number at 6 days *in vitro* (Fig. 4A, Supplementary Fig. 6). We then addressed whether there would be an effect on synaptogenesis and found a decreased expression of both presynaptic (synaptophysin and synapsin) and postsynaptic (PSD95) markers (Fig. 5A), without significant change in the ratio of HSP60 and actin (used as loading control) levels (Supplementary Fig. 4C). Decreased amount of synaptic proteins was associated with a  $45 \pm 10\%$  reduction in the number of synapses as estimated by co-localized immunostained puncta of pre- and postsynaptic markers (Fig. 5B).

With time in culture, up to 12 days *in vitro*, OPA1 downregulation (Supplementary Fig. 7) continued to negatively impact on both pre- and postsynaptic protein expression as estimated by western blot (Fig. 5C) or immunofluorescence microscopy (Fig. 5D, Supplementary Fig. 2B); their quantities staying nearly constant in small interfering RNA against OPA1-treated neurons as opposed to the expected increase in control neurons. The number of synapses decreased by 1.7- and 4-fold upon OPA1 downregulation at 9 and 12 days *in vitro*, respectively (Fig. 5E), while their respective quantities in the control situation increased by 1.7-fold from 9 to 12 days *in vitro*.





**Figure 2** Mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species level and NRF2 nuclear translocation during neuronal maturation. Quantification of JC-1-based mitochondrial membrane potential (590/525 nm ratio) (A) and of reactive oxygen species (ROS) level (B) at 4, 6 and 8 days *in vitro*. In both cases, bars represent the mean  $\pm$  SEM of JC-1 ratio and CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence values from one representative experiment (five culture dishes) out of five experiments (AU = arbitrary units). (C) Nuclear translocation of the transcription factor NRF2 estimated by immunostaining at 4, 6 and 8 days *in vitro* ( $n = 4$ ). Effect of Trolox<sup>TM</sup> antioxidant treatment (100  $\mu$ M for 6 h) at 6 days *in vitro* on (D) reactive oxygen species level (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) and (E) on mitochondrial size [ratio of mean  $\pm$  SEM of long (2 to 10  $\mu$ M) versus short (0.3 to 2  $\mu$ M) mitochondria (average of 1500 mitochondria per 35 neurons per time point,  $n = 3$ ). Statistical significance was determined by Student's *t*-test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . DIV = days *in vitro*.

Interestingly, this prolonged synaptic decrease was then correlated to a reduced dendritic arborization (Fig. 4B–D), without significant impact on the spontaneous apoptotic neuronal death rate (Supplementary Fig. 1D). Starting at 9 days *in vitro*, dendritic morphometric analysis showed a progressive limitation of length of both primary and secondary dendrites up to 12 days *in vitro*, the population of smaller dendrites (<60  $\mu$ m) being highly enriched in small interfering RNA against OPA1-treated neurons (Fig. 4B and C), while dendrite numbers were not affected (Supplementary Fig. 6). Dendritic growth is nevertheless observed but to a lesser extent than in control neurons, as attested by the lower percentages of longer processes. Therefore, we can conclude that impairing OPA1 function sequentially affects synaptogenesis, followed by dendritogenesis.

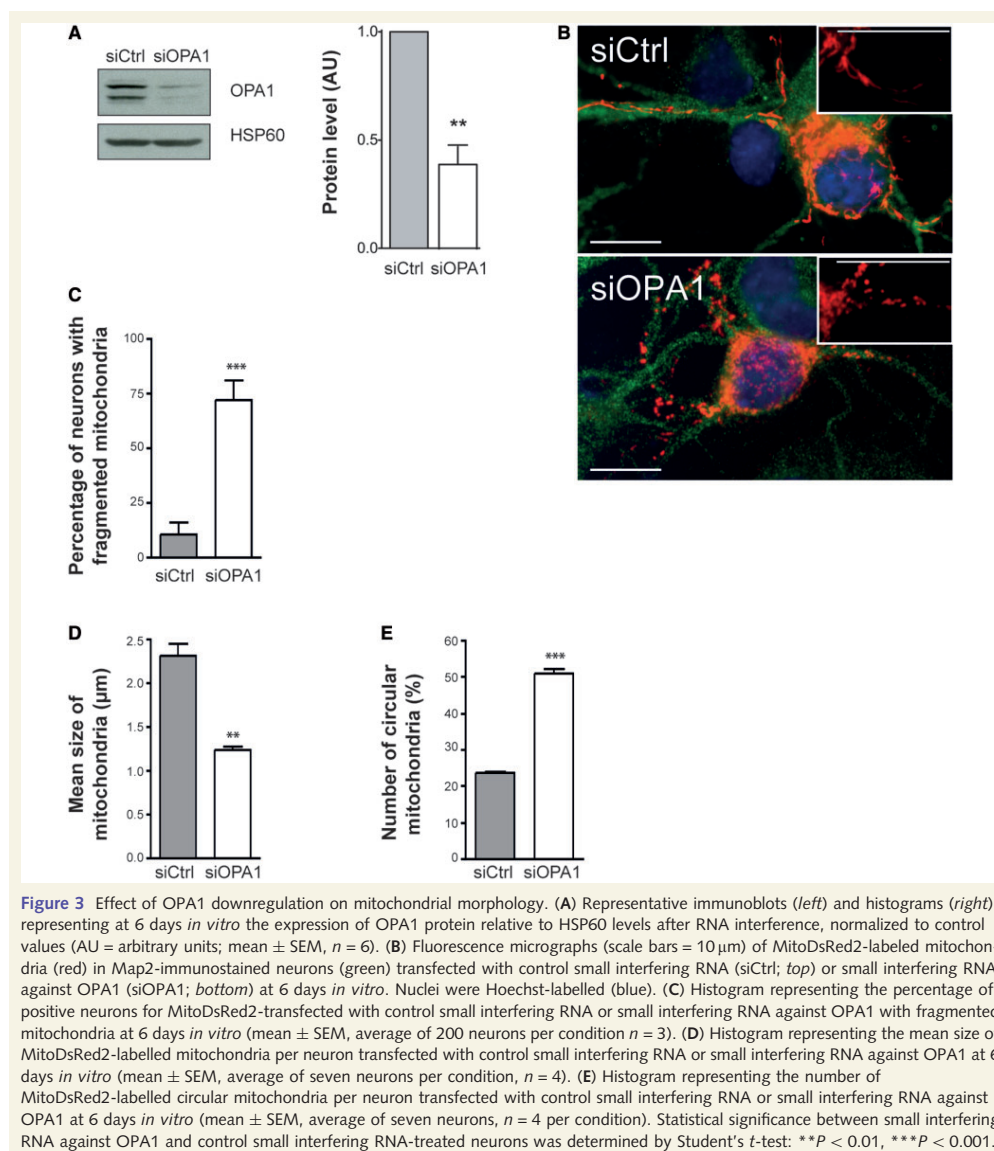
### OPA1 downregulation alters mitochondrial distribution

We thus hypothesized that these synaptic and morphological changes may be linked to modifications of mitochondrial distribution and/or function. In control small interfering RNA and small interfering RNA against OPA1-treated neurons, filamentous and fragmented mitochondria, respectively, were detected along Map2-stained dendrites (Figs 3B, 4D and 6A). However, a quantitative analysis (Fig. 6B and C) showed that impairing OPA1 expression modified dendritic mitochondrial repartition. Mitochondria

were measured (Fig. 6B) and counted (Fig. 6C) in contiguous 21  $\mu$ m regions of interest in dendritic compartments, starting from the cell body. In control neurons, mitochondrial area per region of interest decreased rapidly, with the most proximal dendritic compartment containing almost 2.5-fold more mitochondrial surface than the distal compartments, the number of mitochondria being slightly lower in this compartment (Supplementary Fig. 8A). Upon OPA1 knockdown, mitochondria were still present in all dendritic compartments up to 170  $\mu$ m from the soma; their area being unchanged along the dendrites (Supplementary Fig. 8B) and their number being slightly lower in distal part of the dendrites (Supplementary Fig. 8B). However, when compared with the control neuron values, the mitochondrial area per region of interest in small interfering RNA against OPA1-treated neurons was reduced along the dendrites, by  $\sim 9$ -fold in the more proximal part of the dendrites, and  $\sim 2$ -fold further along the dendrites (Fig. 4B); the number of mitochondria being significantly different only in the most proximal part of the neurites.

Because the overall mitochondrial mass was constant, as assessed by immunoblots of HSP60 (Supplementary Fig. 4C), our data suggested that OPA1 downregulation led, as soon as 6 days *in vitro*, to an increase in mitochondria in the soma and a reduction in the number of dendritic mitochondria, the fragmented organelles, however, being evenly distributed along the dendrites.

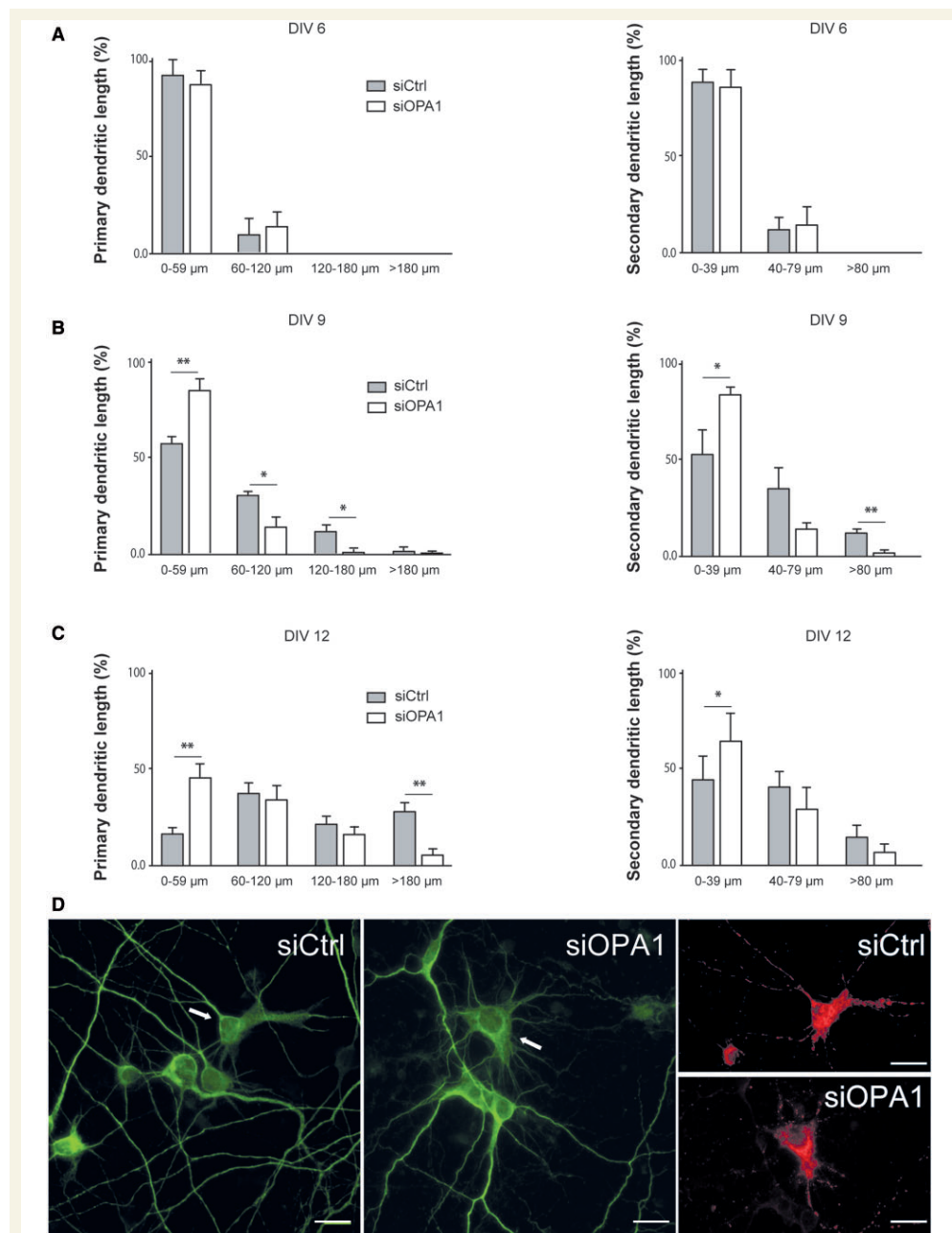




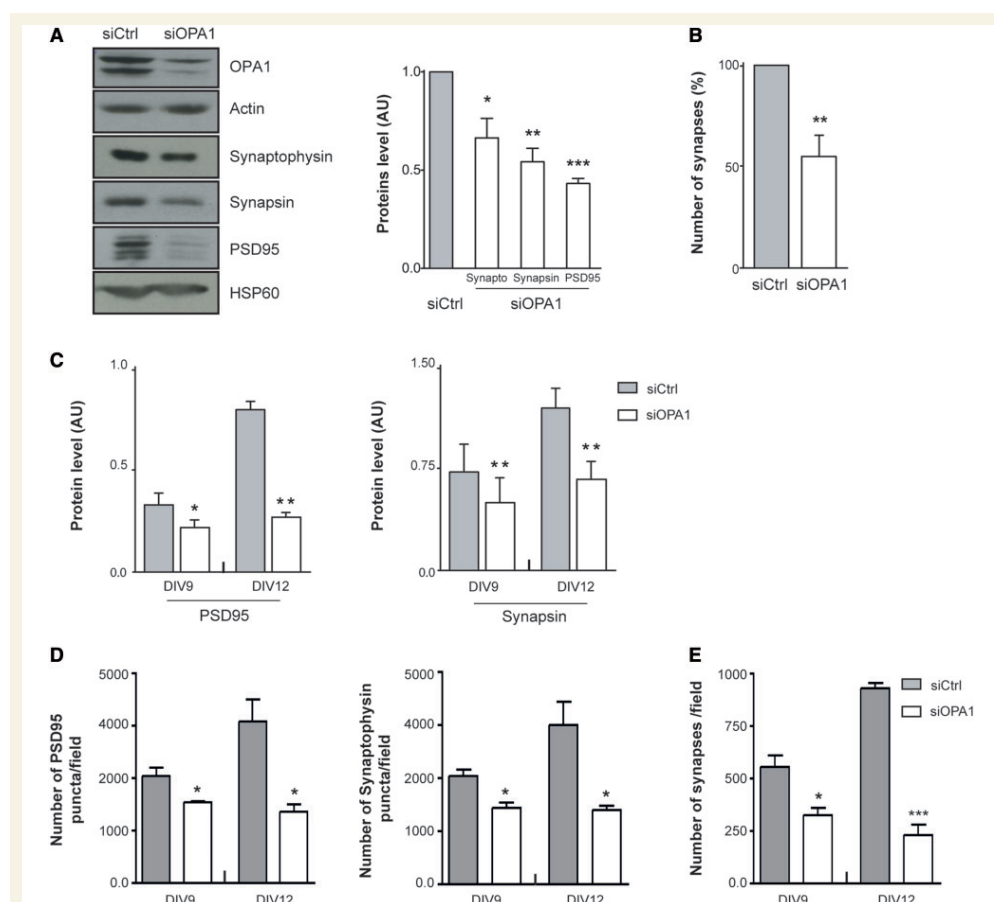
### OPA1 downregulation alters mitochondrial functioning

Following our hypothesis, we tested the effect of OPA1 knock-down on mitochondrial energetics. Mitochondrial membrane potential in cortical neurons transfected with OPA1-targeting or

control small interfering RNA was estimated on 6 days *in vitro* by spectrofluorometry using the voltage-sensitive dye JC-1. The ratio of red to green fluorescence revealed a  $25 \pm 3\%$  decrease in mitochondrial membrane potential of OPA1-depleted cells (Fig. 7A), which could reflect a reduced respiratory rate. Accordingly, a  $22 \pm 7\%$  decrease in reactive oxygen species



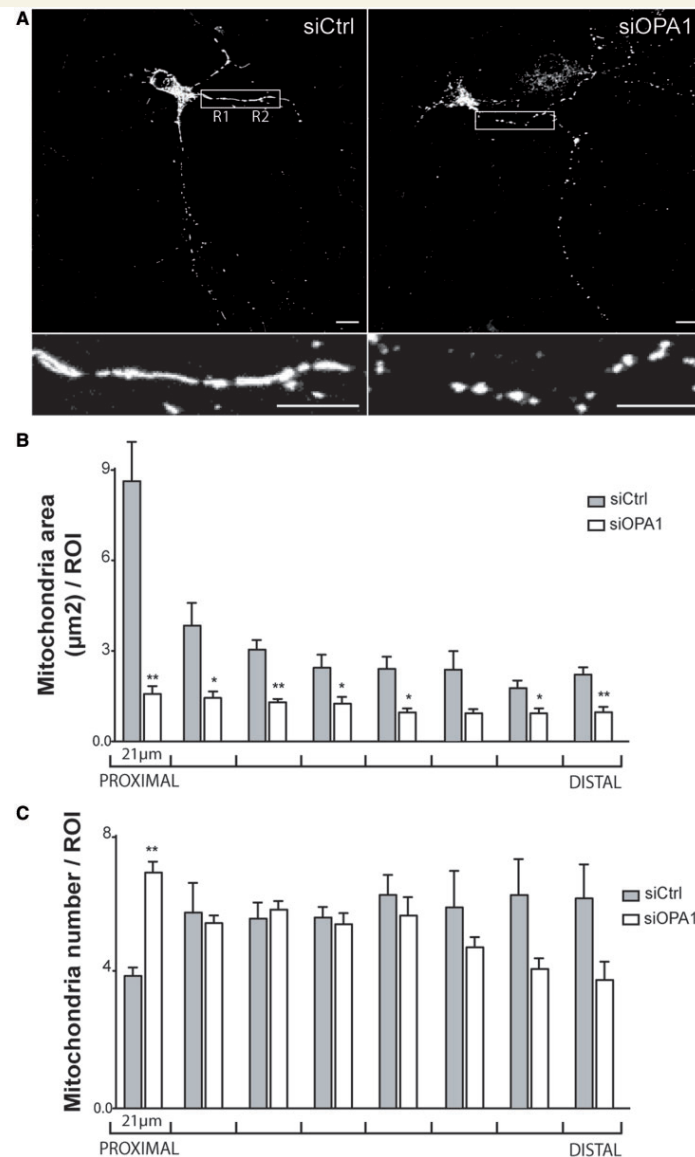
**Figure 4** Effect of OPA1 downregulation on dendritic arborization. Histograms representing the quantification of Map2-immunostained primary (left) and secondary (right) dendrites length at 6 days *in vitro* (A), 9 days *in vitro* (B) and 12 days *in vitro* (C) after OPA1 downregulation. Bars represent the percentage of neurons with dendrites per class length (mean  $\pm$  SEM, average of 30 neurons per (continued)



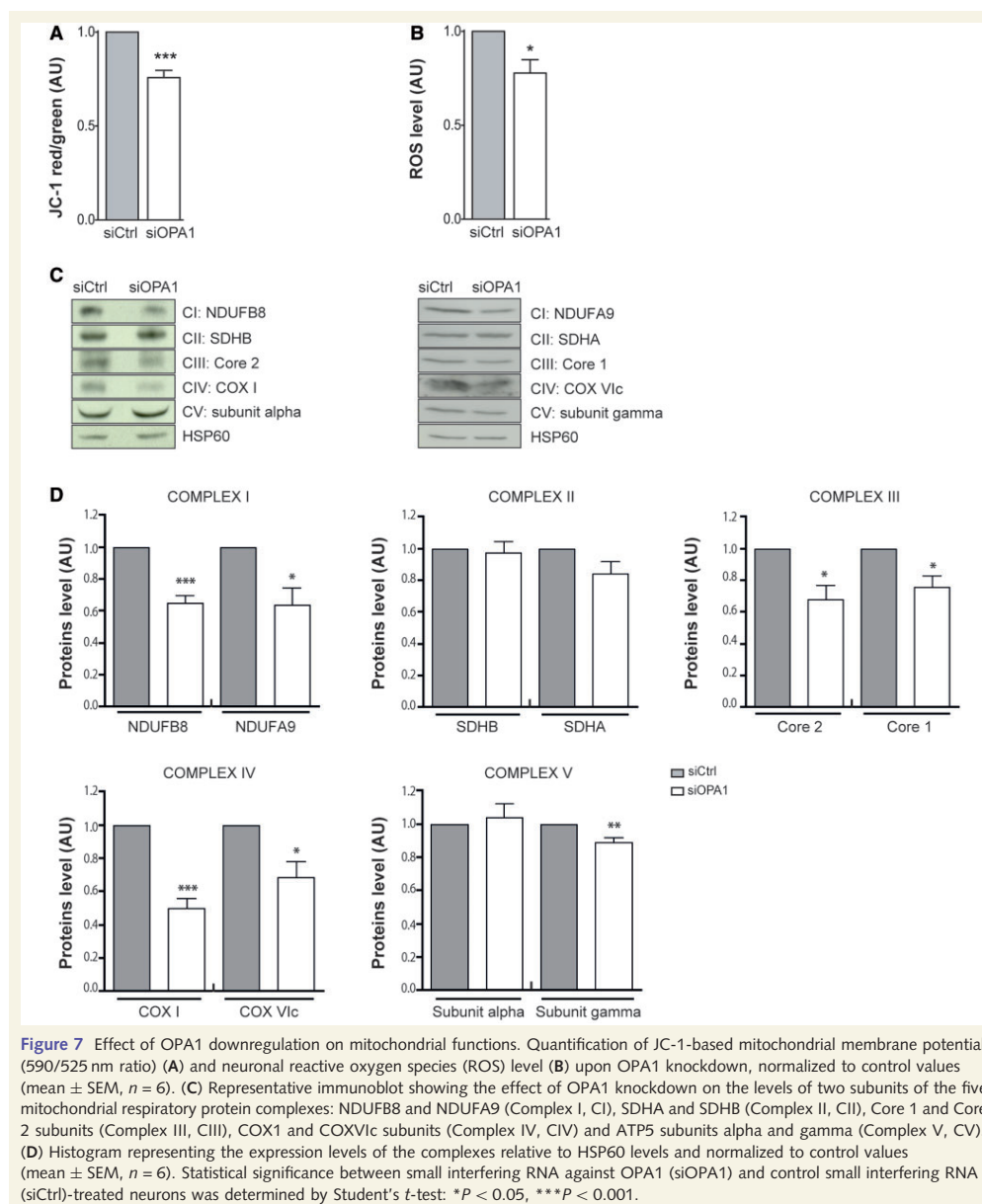
**Figure 5** Effect of OPA1 downregulation on synaptic proteins. **(A)** Representative immunoblot showing the effect of OPA1 knockdown on the expression of synaptic proteins at 6 days *in vitro* (left), with the histogram representing the expression of the synaptic proteins relative to actin normalized to control values (right). **(B)** Histograms representing the quantification of synapses at 6 days *in vitro* determined by the number of co-localized presynaptic and postsynaptic immunostained markers, normalized to control values (AU = arbitrary units; mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). **(C)** Histograms representing the impact of OPA1 downregulation on the quantities estimated by western blot of PSD95 (post-synaptic marker, left) and synapsin (presynaptic marker, right) at 9 and 12 days *in vitro* relative to actin (mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ). **(D)** Histograms representing the impact of OPA1 downregulation on the quantities, estimated by immunofluorescence microscopy, of PSD95 (left) and synaptophysin (presynaptic marker, right) at 9 and 12 days *in vitro*. Bars represent the numbers of pre- or postsynaptic puncta per field (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). **(E)** Histograms representing the quantification of synapses at 9 and 12 days *in vitro* determined by the number of co-localized pre- and postsynaptic immunostained puncta per field (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). Statistical significance between small interfering RNA against OPA1 (siOPA1) and control small interfering RNA (siCtrl)-treated neurons was determined by Student's *t*-test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . DIV = days *in vitro*.

#### Figure 4 Continued

condition,  $n = 3$ ). Statistical significance between small interfering RNA against OPA1 (siOPA1) and control small interfering RNA (siCtrl)-treated neurons was determined by Student's *t*-test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . **(D)** Representative fluorescence micrographs of 12 days *in vitro* Map2-stained neurons transfected with control small interfering RNA (left) and small interfering RNA against OPA1 (centre). Representative neurons (white arrow) are shown in the right panels to show the mitoDsRed2-labelled mitochondria. Scale bars = 10  $\mu$ m. DIV = days *in vitro*.

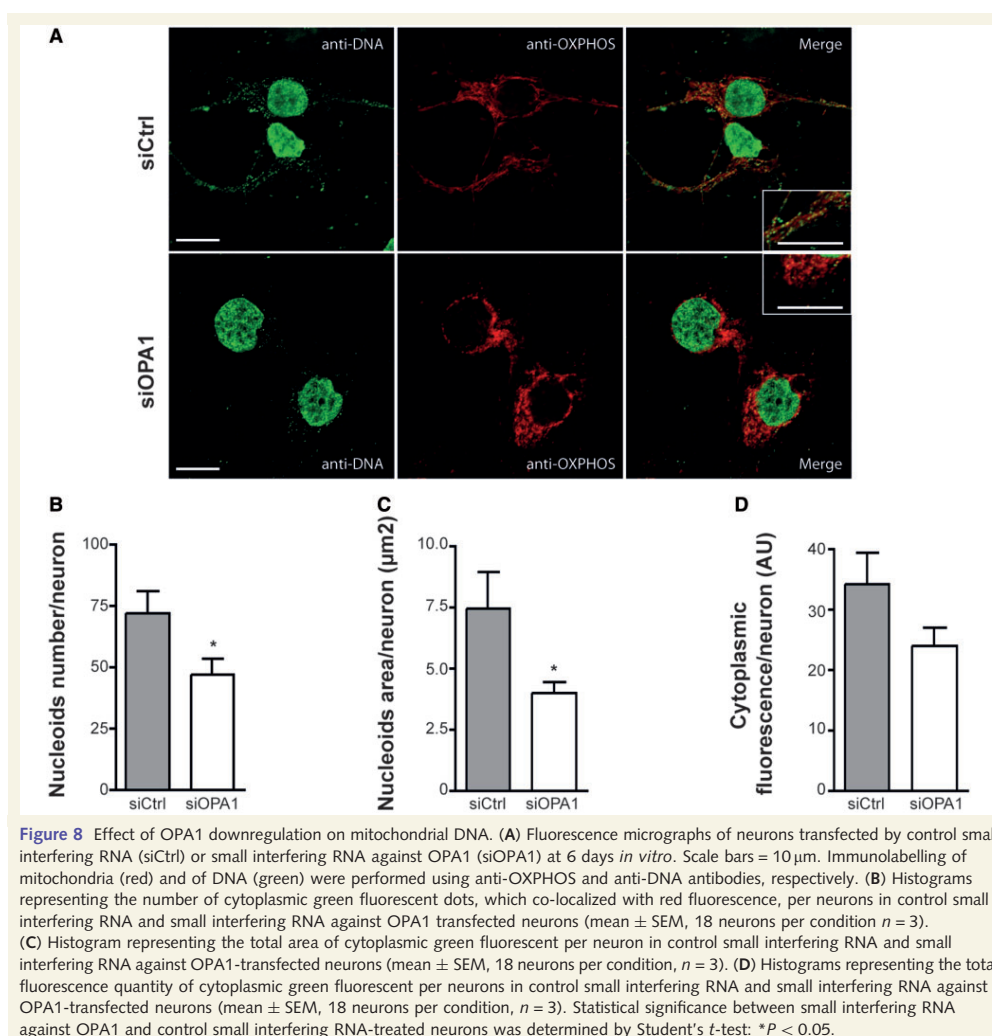


**Figure 6** Effect of OPA1 downregulation on mitochondrial distribution in dendrites. (A) Fluorescence micrographs of MitoDsRed2-labelled mitochondria in dendrites. Magnified area in the bottom inserts representing rectangles encompassing two adjacent regions of interest (R1, R2) in the upper panels, show the long mitochondria (control small interfering RNA, left) versus the short ones (small interfering RNA against OPA1, right). Scale bars = 10  $\mu$ m. (B) Histograms representing the mean mitochondrial area in eight dendritic regions of interest (ROIs, 21  $\mu$ m long and 5  $\mu$ m large segments) starting from the most proximal region (mean  $\pm$  SEM, average of seven neurons,  $n = 4$ ). (C) Histogram representing the number of mitochondria in each region of interest (mean  $\pm$  SEM, average of seven neurons,  $n = 4$ ). Statistical significance between small interfering RNA against OPA1 (siOPA1) and control small interfering RNA (siCtrl)-treated neurons was determined by Student's  $t$ -test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



levels was measured under these conditions (Fig. 7B). The decrease in mitochondrial membrane potential may have been due to reduced levels of mitochondrial respiratory chain complexes leading to decreased respiration. Indeed, western blot analysis of

OPA1-depleted cells showed lower levels of two representative subunits of Complexes I, III and IV (Fig. 7C and D). In small interfering RNA against OPA1 transfected neurons the levels of NDUFB8 and NDUFA9 (Complex I) were  $65 \pm 5\%$  and  $64 \pm 11\%$



of the control, respectively; Core 2 and Core 1 subunit (Complex III)  $68 \pm 9\%$  and  $75 \pm 7\%$ , respectively; and COX1 and COXIVc subunit (Complex IV)  $50 \pm 6\%$  and  $68 \pm 10\%$ , respectively. No significant change was noticed for SDHA and B (Complex II), while the levels of the two subunits from Complex V were not significantly affected ( $\alpha$  subunit) or only slightly decreased ( $\gamma$  subunit).

The decreased levels of mitochondrial DNA-encoded COX1 subunit prompted us to investigate if OPA1 downregulation led to mitochondrial DNA depletion in neurons, as it was previously described in non-neuronal cells (Elachouri *et al.* 2011).

Mitochondrial DNA was evaluated by immunofluorescence microscopy using anti-DNA antibodies (Fig. 8). In control neurons green fluorescent dots, which correspond to mitochondrial DNA nucleoids, appeared evenly distributed within the mitochondrial network (Fig. 8A). At 6 days *in vitro*, downregulation of OPA1 led to a decreased number of mitochondrial DNA nucleoids ( $47 \pm 6$ ) when compared with control neurons ( $72 \pm 9$ ) (Fig. 8B), without major perturbations of their distribution (Fig. 8A). The total nucleoids area per neuron decreased in the same proportion in small interfering RNA against OPA1-treated neurons ( $7.4 \pm 9$  and  $4.7 \pm 0.6$  in control small interfering RNA

and small interfering RNA against OPA1 cells, respectively, Fig. 8B), suggesting that no major alteration of nucleoid morphology occurred. Finally, total green cytoplasmic fluorescence diminished in small interfering RNA against OPA1 cells in the same proportion ( $34 \pm 5$  and  $24 \pm 3$  in control small interfering RNA and small interfering RNA against OPA1-treated neurons, respectively), indicating that the total quantity of mitochondrial DNA is diminished (Fig. 8D).

## Discussion

A growing body of evidence implicates mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases (Chen and Chan, 2009). Furthermore, links emerge between mitochondrial dynamics and neuronal physiology, particularly in terms of the reciprocal regulation of synapses and mitochondria (Li *et al.*, 2004; Verstreken *et al.*, 2005). On the other hand, few studies have focused on neuronal maturation, and are mainly concentrated on DRP1, which promotes mitochondrial fission (Li *et al.*, 2008). We show here that establishment of a transitory hyperfilamentous mitochondrial network is crucial for synaptic maturation *in vitro*, and that this process is impaired by downregulation of the fusogenic OPA1 protein through alterations in oxidative metabolism exacerbated by a reduction in dendritic mitochondrial content. This results in reduced dendritic growth and synaptogenesis that could be related to impaired synaptic plasticity in adulthood associated with neurodegenerative diseases, and thus could participate in the aetiology of DOA.

Investigating the evolution of mitochondrial morphology during neuronal maturation in primary culture, we show that the mitochondriome of cortical neurons is filamentous, in line with previous reports (Chang and Reynolds, 2006; Uo *et al.*, 2009; Voccoli and Colombari, 2009). In mature primary neuronal cells, mitochondrial size has been reported to increase by 20% compared with immature cells (Chang and Reynolds, 2006). During the course of neuronal maturation *in vitro*, our results demonstrate a transitory mitochondrial hyperfilamentation, mitochondrial size increasing at 6 days *in vitro* and decreasing thereafter to initial levels. This early transitory hyperfilamentation correlates with expression changes, *in vitro*, of the fission and fusion proteins that control mitochondrial morphology. The long form of the fission protein DRP1 was present at all days *in vitro* in culture and during development, while the short isoform was only present at the embryonic Day 17 stage. This pattern might be related to differential messenger RNA splicing, as cortical neurons have been reported to express several splice variants of DRP1, including a neuron-specific isoform that incorporates exon 3 (Uo *et al.*, 2009), although nothing is known about their respective functions. Mitofusins behave differently during maturation, with MFN1 disappearing at 6 days *in vitro*, and after post-natal Day 1 *in vivo*, while MFN2 levels remain constant in both cases. Meanwhile, the ratio of the long fusogenic OPA1 isoform (Ishihara *et al.*, 2006) over the short 'd' isoform continuously increased from 2–12 days *in vitro*. Because the fusogenic action of OPA1 depends critically on MFN1 (Cipolat *et al.*, 2004), the filamentation process should be controlled by the OPA1/MFN1 ratio. Given the concomitant increase in the expression of the OPA1 long isoform and decrease in the expression of

MFN1 at 6 days *in vitro*, this ratio could be responsible for the transient nature of this hyperfilamentation.

The general assumption is that longer filaments are beneficial for mitochondrial energy supplies, while fragmented mitochondria are more suitable for transport (reviewed in Westermann, 2012). Increase in mitochondrial filamentation has been shown to precede differentiation in immortalized neuroblasts (Voccoli and Colombari, 2009), as well as in myoblasts (De Palma *et al.*, 2010) and in embryonic stem cells (Wilkerson and Sankar, 2011), suggesting a broader biological significance of this phenomenon. Therefore, the transitory increase in mitochondrial filamentation that we observed at 6 days *in vitro*, simultaneously with the onset of synaptophysin expression, could be a specific requirement of this stage of maturation, with mitochondria later fragmenting for transportation to remote parts of mature neurons. Interestingly, seminal work by Li *et al.* (2004) demonstrated that the number of mitochondria within dendritic protrusions increased during the active period of synaptogenesis and spine development in culture, together with local mitochondrial branching and filamentation. Furthermore, a creatinine-dependent increase in mitochondrial membrane potential has been reported to lead to an increase in the density of spines and synapses (Li *et al.*, 2004), and ATP-dependent augmentation of synaptic activity is correlated with an increase in dendritic mitochondrial size (Chang *et al.*, 2006). Reciprocally, impairing mitochondrial function with carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone has been reported to lead to neuritic retraction through mitochondrial membrane potential drop and fragmentation (Voccoli and Colombari, 2009), while the increase in oxidative metabolism that accompanies mitochondrial elongation seemed to be required for stem cell differentiation (Chung *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2011; Wilkerson and Sankar, 2011). In line with these reports, both mitochondrial hyperfilamentation as well as synaptic marker expression and synapse number are impaired in OPA1-depleted cells, together with mitochondrial functioning (see below).

Recent work demonstrates that reactive oxygen species, which are frequently viewed as toxic molecules, play a crucial role in signalling pathways (Hamanaka and Chandel, 2010). The modest transitory increase in reactive oxygen species levels at 6 days *in vitro*, which we identified at the onset of synaptogenesis, may impinge on cell signalling, an idea in line with previous studies reporting increased reactive oxygen species levels during neuronal differentiation (Tsatmali *et al.*, 2005). At this same early stage of maturation, we report a transitory increase in the nuclear translocation of the transcription factor NRF2, depletion of which was recently shown to delay *in vitro* neuronal differentiation (Zhao *et al.*, 2009). Furthermore, antioxidant treatment at 6 days *in vitro* reduced reactive oxygen species levels, but did not interfere with the transitory hyperfilamentation, indicating that the observed increase in reactive oxygen species levels is downstream of the increase in mitochondrial size. Altogether, our findings suggest a transient requirement for mitochondrial hyperfilamentation during neuronal maturation leading to reactive oxygen species-dependent NRF2 signalling. Thus, as has been suggested for embryonic stem cells (Mandal *et al.*, 2011), during early neuronal maturation, mitochondria may trigger specific retrograde signals,



including activation of transcription factors, that could travel to the nucleus and modulate the transcription of specific target genes.

Interfering RNA-mediated knockdown of OPA1, which led to a reduced expression of pre- and postsynaptic marker proteins and a decrease in synapse number as early as 6 days *in vitro*, had no impact on neuronal dendritic arborization (dendrite length and branching), hence on neuritogenesis at that stage. However, at 9 days *in vitro* and up to 12 days *in vitro*, dendritic growth became affected, and synaptic protein expression remained low. This suggests a new consequence of OPA1 extinction in neuronal maturation, first affecting synaptic maturation and later dendritic growth.

Deleterious effects of the profusion OPA1 loss of function on synapses and dendrites development could be expected given the crucial role of DRP1 and mitochondrial fission during the formation and maintenance of synapses and dendritogenesis (Supplementary Table 2). Inhibiting DRP1 in primary hippocampal neurons reduced dendritic mitochondrial content and led to a loss of synapses and dendritic spines whereas its overexpression increased dendritic mitochondrial content and enhanced the number and plasticity of spines and synapses (Li *et al.*, 2004, 2008; Wang *et al.*, 2009). However, controversial data have been reported by Dickey and Strack (2011), whose study of the opposing roles of enzymatic DRP1 inactivation/activation by phosphorylation/dephosphorylation in regulating neuronal development in hippocampal primary neurons led them to conclude that dendritic mitochondrial content and synapse number appeared negatively correlated (Dickey and Strack, 2011). Nonetheless, primary forebrain DRP1<sup>-/-</sup> neurons show both defective synapses and decreased numbers of neurites (Ishihara *et al.*, 2009).

Several studies have demonstrated that DRP1 extinction perturbs synaptic development by drastically impairing the trafficking of mitochondria to neuronal processes (Li *et al.*, 2004; Verstreken *et al.*, 2005). On the other hand, we show here that mitochondrial fragmentation owing to impaired fusion resulted in a uniformly decreased mitochondrial occupancy in dendrites, in agreement with previous results obtained in transfected hippocampal neurons (Wang *et al.*, 2009).

Overall, our data suggest that the impact of OPA1 knockdown on synaptogenesis and dendritogenesis occurs through disruption of mitochondrial oxidative metabolism, exacerbated by the reduction in mitochondrial content. Indeed, we found that OPA1 knockdown led to reduced protein levels of the respiratory chain Complexes I, III and IV, which could be due to cristae disorganization (Olichon *et al.*, 2003) impacting the stability and integrity of membrane-bound respiratory complexes or supra-complexes. Therefore, OPA1 could be suggested to be important for supra-complex formation or stabilization, structures known to optimize the respiratory complex activity and consequently ATP production (Lenaz and Genova, 2009). Alternatively, loss of mitochondrial DNA, which encodes part of Complexes I, III and IV would lead to the same results. We indeed showed that downregulation of OPA1 induced mitochondrial DNA depletion in neurons as previously reported in HeLa cells (Elachouri *et al.*, 2011). Reduction of respiration was previously reported in OPA1-depleted non-neuronal cells, as well as in fibroblasts from patients with DOA bearing OPA1 mutations (Landes *et al.*, 2010). This

phenotype also applies to cortical neurons because OPA1 knockdown led to a decrease in mitochondrial membrane potential concomitant with a decrease in reactive oxygen species levels.

Finally, our findings suggest that OPA1 is required for proper mitochondrial functioning when energy needs are enhanced, e.g. for the formation and/or maintenance of synapses, and on dendritic growth, which mutually impact on each other. Our data offer new insights into both the impact of mitochondrial dynamics on CNS neuronal functioning, and the pathological processes leading to DOA. The first effect of OPA1 downregulation that we observed in cultured primary neurons is the decrease of the number of synapses that could be attributed to a reduction of the quantity of synaptic markers since both are decreased to the same extent at 9 days *in vitro* (reduction of ~1.7 and ~1.4-fold in small interfering RNA against OPA1 versus control small interfering RNA, respectively). Later, in mature neurons (12 days *in vitro*) the levels of synapses are more affected than those of synaptic markers (reduction of ~4 and ~2-fold in small interfering RNA against OPA1 versus control small interfering RNA, respectively), suggesting that maintenance of synapses is also affected. Early synaptic alterations are hallmarks of numerous neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, an age-related neurodegenerative process (Terry *et al.*, 1991; Masliah *et al.*, 2001). Similarly, early synaptic defects observed in Alzheimer's disease were recently associated with mitochondrial dysfunctions (Lee *et al.*, 2012). Thus in DOA, an insufficient amount of OPA1 could reduce synapse formation in developing retinal ganglionic cells and induce, in time and/or under stressful conditions such as light exposition, more important synaptic defects resulting in retinal ganglionic cell degeneration. Accordingly, Williams *et al.* (2012) reported a marked reduction in retinal ganglionic cell synaptic connectivity in a DOA mouse model. In this mouse line, synaptic defects are accompanied by retinal ganglionic cell dendritic pruning, which preceded the onset of visual loss and structural changes in the optic nerve (Williams *et al.*, 2010).

In conclusion, unravelling the role of OPA1-dependent mitochondrial dynamics on neuronal maturation and function will illuminate the physiopathological mechanisms underlying DOA and probably other neurodegenerative diseases. Such mechanistic details could give rise to long-awaited therapeutic solutions. In line with the current emerging hypothesis that impairment of mitochondrial dynamics is an early event in most neurodegenerative pathologies, playing a pivotal role in neuronal plasticity dysfunction, our findings may help to define targets that precede further cytotoxic phenomena.

## Acknowledgements

We thank Nicolas Heck for helping with ImageJ macro encoding, Manuel Rojo for the gift of anti-MFN1 antibodies, Géraldine Hoffer for sharing her expertise in primary neuronal culture, Alain Roulet for helping with statistical analyses and Brice Ronsin for helping with Velocity macro encoding and technical assistance in confocal analysis on the Toulouse RIO imaging platform. We thank Vincent Setola, Jean-Michel Peyrin, Valérie Mils, Laëtitia



Arnaun   and Didier Miquel-Vilette for critical reading of the manuscript and thoughtful discussions.

## Funding

This project was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Universit   Paul Sabatier, R  tina-France, the Association Fran  aise contre les Myopathies, the Union Nationale Des Aveugles et D  ficients Visuels, 'Gueules Cass  es' and the Association contre les Maladies Mitochondriales. A.B. was funded by the French Ministry for Research and Education and R  tina-France for PhD studies.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrolier A, Ferr   M, Guillet V, et al. OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1855–65.
- Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 502–10.
- Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 1995; 42: 674–83.
- Chang DT, Honick AS, Reynolds IJ. Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 7035–45.
- Chang DT, Reynolds IJ. Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 2006; 141: 727–36.
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics–fusion, fission, movement, and mitophagy–in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2009; 18: R169–76.
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 2007; 130: 548–62.
- Chung S, Dzeja PP, Faustino RS, Perez-Terzic C, Behfar A, Terzic A, et al. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4 (Suppl 1): S60–7.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15927–32.
- De Palma C, Falcone S, Pisoni S, Cipolat S, Panzeri C, Pambianco S, et al. Nitric oxide inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission is critical for myogenic differentiation. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1684–96.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000; 26: 207–10.
- Dickey AS, Strack S. PKA/AKAP1 and PP2A/Bbeta2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci* 2011; 31: 15716–26.
- Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, et al. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* 2011; 21: 12–20.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126: 177–89.
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 505–13.
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 2006; 25: 2966–77.
- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 958–66.
- Landes T, Leroy I, Bertholet A, Diot A, Khosrobakhsh F, Daloyau M, et al. OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21: 593–8.
- Lee SH, Kim KR, Ryu SY, Son S, Hong HS, Mook-Jung I, et al. Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2012; 17: 5953–63.
- Lenaz G, Genova ML. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1750–72.
- Li H, Chen Y, Jones AF, Sanger RH, Collis LP, Flannery R, et al. Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2169–74.
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004; 119: 873–87.
- Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 486–95.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001; 56: 127–9.
- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 7743–6.
- Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 682–92.
- Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neuro)generation. *Neuron* 2011; 70: 1033–53.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synaptic loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30: 572–80.
- Tsatmali M, Walcott EC, Crossin KL. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res* 2005; 1040: 137–50.
- Uo T, Dworak J, Kinoshita C, Inman DM, Kinoshita Y, Horner PJ, et al. Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 2009; 218: 274–85.
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 2005; 47: 365–78.
- Voccoli V, Colombaioni L. Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts. *Brain Res* 2009; 1252: 15–29.
- Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2009; 29: 9090–103.
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 872–84.
- Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 2012; 10: 1833–8.
- Wilkerson DC, Sankar U. Mitochondria: a sulphydryl oxidase and fission GTPase connect mitochondrial dynamics with pluripotency in embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1252–6.

- Williams PA, Morgan JE, Votruba M. OPA1 deficiency in a mouse model of dominant optic atrophy leads to retinal ganglion cell dendropathy. *Brain* 2010; 133: 2942–51.
- Williams PA, Piechota M, Von Ruhland C, Taylor E, Morgan JE, Votruba M. OPA1 is essential for retinal ganglion cell synaptic architecture and connectivity. *Brain* 2012; 135: 493–505.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, et al. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 2010; 133: 771–86.
- Zhao F, Wu T, Lau A, Jiang T, Huang Z, Wang XJ, et al. Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 867–79.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; 36: 449–51.

# Discussion Générale

# DISCUSSION GENERALE

---

Depuis la découverte par notre équipe et ses collaborateurs en 2000 du gène codant la protéine mitochondriale OPA1 (Delettre et al. 2000b), dont les mutations sont responsables de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1), de nombreuses pistes d'études ont été envisagées pour comprendre l'étiologie de cette rétinopathie. Le rôle d'OPA1 dans la fusion des mitochondries et sa fonction anti-apoptotique ont été abondamment décrits dans la littérature (Bereiter-Hahn and Jendrach 2010; T Landes et al. 2010). Ces dernières années, l'hypothèse de l'implication d'OPA1 dans la dérégulation des fonctions énergétiques mitochondriales a été proposée et étudiée dans des modèles cellulaires ou animaux de l'ADOA-1, et dans des cellules ou tissus issus de patients (Agier et al. 2012; Chen et al. 2005a; Chevrolier et al. 2008; Kanazawa et al. 2008; Lodi et al. 2004; Tang et al. 2009). Certains travaux révèlent des diminutions de la respiration cellulaire et de la production d'ATP consécutives à des mutations ou invalidations du gène *OPA1*, mais ces résultats restent controversés et les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacent mal connus (Mayorov et al. 2008; Spinazzi et al. 2008). Mes travaux de thèse ont permis de préciser l'impact de la diminution d'expression d'OPA1 sur l'homéostasie redox et ont ouvert de nouvelles perspectives sur l'analyse du statut antioxydant des cellules pour proposer des thérapeutiques personnalisées aux patients atteints d'ADOA-1. L'analyse de l'environnement protéique de la dynamine fournit des pistes pour comprendre l'implication d'OPA1 dans le métabolisme oxydatif et propose une relecture de ses fonctions afin d'appréhender au mieux ses dysfonctions. Enfin, nous proposons que des défauts de la morphologie et de la fonctionnalité énergétique des mitochondries dans des neurones invalidés pour OPA1 seraient responsables de l'altération de la synaptogenèse et donc de la maturation neuronale.

## **La diminution d'OPA1 entraîne un déséquilibre de l'homéostasie redox vers un état pro-oxydant**

Bien que la pathologie de l'ADOA-1 soit décrite comme neurodégénérative, nous avons fait le choix de travailler également dans des cellules HeLa et de présenter les résultats au même titre que les neurones en culture primaire. En effet, nous avons pu démontrer que la mécanistique intracellulaire impliquée en réponse à la diminution d'OPA1 est « pluri-tissulaire » car elle ne

s'applique pas uniquement à des cellules neuronales, ce qui permet d'intégrer ce travail dans un contexte physiologique et physiopathologique plus global.

### **Le métabolisme oxydatif mitochondrial est altéré dans des cellules dont la quantité d'OPA1 est diminuée**

Comme précédemment, afin de mimer une haploinsuffisance du gène *OPA1*, nous avons diminué la quantité de la protéine par une stratégie d'interférence à l'ARN dans des cellules humaines (HeLa) et des neurones corticaux en culture primaire (rat). Nous avons montré que la diminution de la quantité d'OPA1 dans les cellules HeLa (Olichon et al. 2007) et des neurones (Bertholet et al. 2013) provoque une baisse du potentiel de membrane mitochondrial. Ce phénomène est d'ailleurs retrouvé dans MEFs invalidés pour OPA1 par interférence à l'ARN (Chen et al. 2005b). Cette diminution traduirait une perturbation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, nous avons montré que la respiration spontanée est significativement diminuée dans les cellules HeLa et les neurones dont l'expression d'OPA1 est diminuée. Ces résultats corréleraient avec les données obtenues dans des MEFs déplétés pour OPA1 (Chen et al. 2005b), des fibroblastes ou des muscles issus de patients atteints d'ADOA-1 (Amati-Bonneau et al. 2005; Chen et al. 2005; Chevrollier et al. 2008; Cipolat et al. 2004; Lodi et al. 2004; Song et al. 2007; Song et al. 2009; Zanna et al. 2008), chez le poisson zèbre invalidé pour OPA1 (Rahn et al. 2013) et chez la drosophile *dOPA1<sup>+/-</sup>* (Tang et al. 2009). De manière surprenante, l'ajout de l'agent découplant FCCP n'augmente pas plus la respiration cellulaire, contrairement au poisson zèbre invalidé pour OPA1 (Rahn et al. 2013). Ainsi, dans nos modèles cellulaires d'ADOA-1, la respiration spontanée serait maximale. Ce phénomène a déjà été décrit dans des modèles cellulaires ou animaux de maladies neurodégénératives comme la souris TG2576 modèle de la maladie d'Alzheimer (Varghese et al. 2011) ou dans des cellules striatales modèles de la maladie de Huntington (STHdhQ111) (Siddiqui et al. 2012). De manière intéressante, dans des cellules dopaminergiques N27 en culture, l'ajout de paraquat (molécule qui induit un stress oxydatif en inhibant le complexe I) ne perturbe pas la respiration spontanée des cellules mais altère la capacité respiratoire maximale des mitochondries (Lopert et al. 2012). Dans ce modèle, l'inhibition du système antioxydant thioredoxine/peroxiredoxine cumulée avec le traitement par le paraquat induit une diminution des différents stades respiratoires (spontané et maximal), tout comme dans nos modèles cellulaires invalidés pour OPA1. Ainsi, perturber l'état redox intracellulaire induit les mêmes conséquences sur l'activité mitochondriale que la perte d'OPA1.

A la lumière de mes travaux de thèse et des données bibliographiques, deux questions se posent alors : i) par quels mécanismes la diminution d'OPA1 induit-elle une perturbation de la

respiration mitochondriale spontanée ? ii) pourquoi la respiration n'est-elle pas stimulée par l'ajout d'un agent découplant dans des cellules déplétées pour OPA1 ?

Nous avons montré que les neurones (Bertholet et al. 2013) et les cellules HeLa, invalidés pour OPA1, présentent une diminution de la quantité de certaines sous-unités représentatives des complexes de la chaîne respiratoire. Les complexes I, II, III et IV sont affectés, alors que la quantité du complexe V reste inchangée. De plus, des interactions d'OPA1 avec les complexes respiratoires I, II et III, ont été retrouvés par co-immunoprécipitations dans des fibroblastes humains (Zanna et al. 2008). Nous pouvons donc proposer la dissociation des macro-complexes « OPA1-complexes respiratoires », lors du traitement des cellules par siOPA1, responsable de la déstabilisation des sous-unités et donc de l'intégrité des complexes. Des effets « indirects » de la perte d'OPA1 sont également envisagés étant donné son rôle dans le maintien de l'ADNmt. En effet, comme il a déjà été décrit dans des cellules HeLa (Elachouri et al. 2010) et des MEFs KO pour OPA1 (Chen et al. 2007; Chen et al. 2010), nos analyses montrent que le nombre de nucléoïdes est également altéré par la perte d'OPA1 dans les neurones cultivés *ex vivo* (Bertholet et al. 2013). Ces résultats corrélerent avec les travaux menés dans des lymphocytes de patients qui montrent une diminution du nombre de copies d'ADNmt (Kim et al. 2005). Des délétions d'ADNmt ont également été observées dans des cellules musculaires de patients atteints du syndrome « ADOA-1 plus » (Amati-Bonneau et al. 2008 ; Hudson et al. 2008). Etant donné que le génome mitochondrial code 13 sous-unités de la chaîne respiratoire, la diminution de la respiration mesurée consécutivement à la perte d'OPA1 pourrait être le reflet de la diminution d'ADNmt. De plus, la sous-unité COXI, codée par le génome mitochondrial, diminue drastiquement dans nos modèles.

La diminution de la quantité de certains complexes respiratoires pourrait entraîner une baisse de leur activité (Chen et al. 2005; Tang et al. 2009) et donc expliquer la diminution de la respiration cellulaire. Or, excepté le complexe II qui diminue d'environ 25 %, l'activité des complexes *in vitro* reste stable dans nos conditions. La diminution de la respiration mitochondriale n'est donc pas le reflet d'un défaut d'activité intrinsèque des complexes. Ainsi, nous proposons une autre hypothèse : l'organisation des complexes respiratoires en supercomplexes. En effet, ces « respirasomes » sont essentiels pour l'assemblage et la stabilité des complexes (Acin-Perez et al. 2004; Diaz et al. 2006; Li et al. 2007) et semblent impliqués dans l'efficacité du transfert d'électrons (Acin-Perez et al. 2014; Vartak et al. 2013). Les complexes respiratoires et les respirasomes sont notamment concentrés au niveau des crêtes mitochondriales car l'essentiel du cytochrome c, le transporteur d'électrons du complexe III au IV, s'accumule dans l'espace intra-crête (Vogel et al. 2006). Sachant que la protéine OPA1 a un rôle prépondérant dans la structuration des crêtes mitochondriales, la perte de fonction de cette dynamine perturbe l'organisation de la membrane

interne (Cipolat et al. 2006; Darshi et al. 2010; Frezza et al. 2006). Ainsi, la diminution de la respiration observée dans nos conditions peut être expliquée par la désorganisation des crêtes qui engendre par voie de conséquence une dissociation des supercomplexes en forme libre (Lenaz and Genova, 2009). Un article paru très récemment met en avant l'importance de la forme des crêtes pour l'assemblage et la stabilité des supercomplexes et l'efficacité de la respiration *in vitro* et *in vivo* (Cogliati et al. 2013). Les auteurs démontrent que la perte d'OPA1 induite dans une lignée immortalisée de fibroblastes issus de souris adultes (MAFs), engendre des défauts de mise en place des supercomplexes. Résultats que les auteurs ont également retrouvés dans des MEFs KO pour OPA1 et *in vivo* dans des mitochondries de foie de souris invalidées de manière inductible pour OPA1. De plus, une surexpression de la protéine OPA1 d'environ 50 % induit des crêtes serrées et une augmentation du nombre de supercomplexes dans des mitochondries de foie de souris (Cogliati et al. 2013). Enfin, l'ajout d'un agent découplant ne stimule pas la respiration spontanée des cellules déplétées pour OPA1. Nous pouvons supposer que la respiration mesurée à l'état spontanée est déjà à son maximum, ce qui implique que le découplage de la phosphorylation oxydative n'ait aucun effet sur la consommation en oxygène. Pour expliquer l'origine de la diminution de la respiration cellulaire dans nos modèles, nous envisageons donc de vérifier la nature et la stabilité des supercomplexes dans nos modèles cellulaires, invalidés pour OPA1 par interférence à l'ARN, avec la technique du Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) (Leary 2012). Un autre travail publié très récemment met en lumière le lien très étroit entre OPA1, la fusion mitochondriale et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) à l'aide d'un outil permettant la visualisation des différents compartiments mitochondriaux par microscopie à fluorescence, *in vitro* (Mishra et al. 2014). En effet, stimuler la respiration mitochondriale, comme par exemple en présence d'un milieu galactose, induit une augmentation de la fusion des membranes internes mitochondriale, suite au clivage de la dynamine OPA1 par la protéase YME1L. Le lien entre la fusion mitochondriale et le métabolisme énergétique serait établi par la dynamique des formes longues et courtes d'OPA1 (Mishra et al. 2014). Cet outil ouvre de nouvelles perspectives de compréhension du lien entre OPA1 et le métabolisme oxydatif et pourrait être utilisé dans des tissus de patients porteurs de mutations du gène *OPA1*, notamment celles responsables d'un effet dominant négatif comme la forme G300E (Landes et al. 2010).

Comme nous pouvons le constater, la perte de la dynamine OPA1 engendre une diminution de la respiration, de la quantité de certains complexes et du nombre de nucléoïdes. Cependant, la biomasse mitochondriale est stable dans les cellules HeLa et les neurones traités par siOPA1, ce qui signifie que les conséquences de l'invalidation de la dynamine ne sont pas liées à des perturbations de la biomasse mitochondriale.

Le défaut de la phosphorylation oxydative des mitochondries de cellules invalidées pour OPA1 pourrait s'accompagner d'un déficit de synthèse d'ATP mitochondrial. Dans nos conditions, les taux d'ATP intracellulaires dans les cellules HeLa et les neurones sont stables. Ces résultats sont en accord avec les dosages d'ATP effectués à partir de fibroblastes ou de muscles issus de patients atteints d'ADOA-1 (Spinazzi et al. 2008; Chevrollier et al. 2008). Néanmoins, dans les mêmes tissus analysés, d'autres études montrent une diminution du taux d'ATP (Lodi et al. 2004; Agier et al. 2012). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : 1) la quantité du complexe V n'est pas affectée par la perte d'OPA1 dans nos modèles, l'activité resterait donc stable, 2) l'ATP serait produit principalement par la glycolyse. Les cellules cultivées sont en présence d'un milieu contenant 4,5 g/L de glucose. Cette « hyperglycémie » favorise la production d'ATP par la glycolyse ce qui implique que nous ne sommes pas dans les meilleures conditions pour analyser l'activité de l'ATP synthase mitochondriale. Toutefois, en conservant nos conditions de culture, nous pourrions déterminer la part de la mitochondrie dans la production totale d'ATP en utilisant l'oligomycine, un inhibiteur du complexe V, ou une technique de FRET avec une sonde qui se fixe sur l'ATP dans la matrice mitochondriale (ATeams, GO-ATeam2) (Imamura et al. 2009; Lefkimmatis et al. 2013; Nakano et al. 2011).

### **Le taux d'EAO intracellulaire est affecté dans des cellules dont la quantité d'OPA1 est diminuée**

Contrairement à ce qui a été démontré chez la drosophile (Tang et al. 2009), la diminution de la quantité d'OPA1 aboutit une diminution du taux d'EAO intracellulaire total dans les neurones (6 jours après la transfection du siOPA1) (Bertholet et al. 2013) et les cellules HeLa (3 jours après la transfection du siOPA1), mesuré à l'aide de la sonde  $H_2$ -DCFDA. Le taux intracellulaire total de NADH,  $H^+$  restant inchangé dans les cellules HeLa invalidées pour OPA1, nous supposons que le complexe I, stable malgré la diminution de la dynamine, est suffisamment alimenté en substrats. Le complexe I capterait donc les électrons de l'équivalent réduit NADH,  $H^+$  mais le transfert aux autres complexes serait ralenti, comme en témoigne la diminution de la respiration. Ces résultats suggèrent que la quantité d'électrons libres augmenterait au niveau du complexe I dans les cellules déplétées pour OPA1, ce qui favoriserait leur interaction avec l'oxygène libre, phénomène à l'origine d'une production d'anion superoxyde dans la mitochondrie (Turrens 1997; Turrens 2003). Cette hypothèse est en accord avec la diminution de l'activité de l'aconitase que nous avons observée dans les deux modèles cellulaires (Tretter et al. 2011). Pour appuyer ces arguments, nous pourrions utiliser la sonde MitoSOX qui s'accumule dans la mitochondrie et devient fluorescente au contact de l'anion superoxyde (Yang et al. 2014). D'autres indicateurs du taux d'EAO, qui ont été développés ces dernières années, permettent des mesures plus sensibles et en temps réel du statut redox intracellulaire *in vitro* et *in vivo* (Lukyanov and Belousov 2014; Wang et al. 2013). Par exemple, la



protéine fluorescente HyPer permet une mesure spécifique du taux de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) car l'oxydation des résidus cystéines par ce radical oxygéné modifie la longueur d'onde d'excitation de HyPer de 420 à 500 nm (Belousov et al. 2006). Les sondes roGFPs (redox oxidation-sensitive green fluorescent protein) permettent de rendre compte du potentiel redox intracellulaire car elles sont sensibles à l'oxydation et les formes oxydées et réduites ne présentent pas les mêmes longueurs d'onde d'excitation, qui de plus varient en fonction du type de roGFPs (de 1 à 6 roGFPs) (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Cet outil pourrait être utilisé en parallèle des dosages des formes réduites et oxydées du glutathion que nous avons déjà réalisés. En effet, le niveau de glutathion réduit est très élevé dans nos deux modèles cellulaires diminués pour OPA1, ce qui suggère une activation du métabolisme du glutathion (Takaya et al. 2012; Yuyun et al. 2013). Les dosages ayant été réalisés 72h et 6 jours après transfection par le siOPA1 pour les cellules HeLa et les neurones respectivement, nous pourrions suivre le statut redox des cellules pendant plusieurs heures après l'extinction d'OPA1. En effet, nous avons pu constater, dans les cellules HeLa déplétées pour OPA1, que le niveau d'EAO intracellulaire mesuré par la sonde  $H_2$ -DCFDA à 48h était identique au contrôle et qu'à 56h le taux d'EAO commençait à diminuer. Les sondes roGFP rendraient compte du statut redox entre 48h et 56h de transfection afin de comprendre la réponse intracellulaire mise en jeu suite à la perte d'OPA1. De plus, nous pourrions obtenir des informations sur l'origine de cette diminution car ces protéines fluorescentes peuvent être adressées aux différents compartiments intracellulaires, comme la mitochondrie (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Enfin, un autre argument en faveur de l'implication d'OPA1 dans la production d'EAO vient d'un modèle drosophile qui exprime des clones *OPA1*<sup>-/-</sup> présents uniquement dans les yeux de l'insecte (Yarosh et al. 2008). En effet, la perte totale d'OPA1 induit un phénotype de l'œil dit rugueux et brillant, caractéristique d'une perte des cellules hexagonales et d'une altération des cônes et des cellules pigmentées, suggérant une augmentation de l'apoptose. En présence de vitamine E ou de SOD1 dans la nourriture, ou en sur-exprimant la forme humaine de SOD1, le phénotype de l'œil s'approche d'un phénotype sauvage suggérant la part importante des EAO dans la mort des cellules *OPA1*<sup>-/-</sup> de l'œil de l'insecte.

### **La voie de signalisation de NRF2 est activée en réponse à la diminution de quantité d'OPA1**

Un autre argument en faveur de la diminution des EAO intracellulaires totaux dans nos modèles est l'activation des défenses antioxydantes. Nous avons pu montrer que la diminution de la protéine OPA1 dans des neurones et des cellules HeLa induit une relocalisation du facteur de transcription NRF2 au noyau, signe de son activation (Gan and Johnson 2013; Takaya et al. 2012; de Vries et al. 2008). De plus, ce phénomène est visible dès 67h après transfection des cellules HeLa par le siOPA1. Nous pouvons donc supposer qu'une augmentation du taux d'EAO intracellulaire, en amont de cette cinétique, est suffisante pour dissocier le complexe NRF2/Keap-1 et permettre une

relocalisation massive de NRF2 dans le noyau. De plus, les quantités protéiques et/ou l'activité enzymatique de cibles de NRF2, comme les superoxydes dismutases, la catalase ou GSTP1, sont augmentées dans nos modèles cellulaires invalidés pour OPA1. Clairement, la diminution d'OPA1 engendre une signalisation antioxydante qui serait responsable de la diminution du taux d'EAO observé 6 jours ou 72h après transfection des neurones ou des cellules HeLa respectivement.

En plus du rôle largement décrit de NRF2 dans la réponse au stress oxydatif par l'activation des défenses antioxydantes, le facteur de transcription est intimement lié au métabolisme énergétique cellulaire. En effet, Heiss EH et collègues ont montré que l'activation de NRF2, par l'inducteur sulforaphane ou par un KO de l'inhibiteur Keap-1 dans des MEFs, induit une modification du métabolisme intracellulaire où la molécule de glucose est préférentiellement dégradée par la voie des pentoses phosphates (Heiss et al. 2013). Nous pouvons suggérer que, en plus de l'activation des défenses antioxydantes comme nous l'avons démontré, la diminution d'OPA1 engendre un changement métabolique des cellules de la mitochondrie vers la voie des pentoses phosphates. De plus, le lactate extracellulaire dans les cellules HeLa invalidées pour OPA1 est stable. Ainsi, même si les cellules HeLa sont principalement glycolytiques du fait de leur origine cancéreuse (Klepinin et al. 2014; Palsson-McDermott and O'Neill 2013; Xie et al. 2014), la diminution d'OPA1 n'augmente pas la production de lactate dans nos conditions. Nous pourrions donc analyser la voie des pentoses phosphates dans nos modèles afin d'approfondir les mécanismes métaboliques qui découlent d'une diminution d'OPA1.

### **Les neurones dont la quantité d'OPA1 est diminuée sont plus sensibles au stress oxydatif induit par la roténone**

Pour déterminer les mécanismes intracellulaires mis en jeu chez les patients atteints d'ADOA-1 qui subissent comme tout un chacun des stress exogènes au quotidien, comme les UVs (Kushibiki et al. 2013) ou l'hypoxie transitoire dans l'œil, nous avons induit un stress oxydatif dans des neurones transfectés par un siOPA1. Tout comme dans les modèles invertébrés (*Drosophila*, *C.Elegans*) porteurs de mutations du gène *OPA1* (Kanazawa et al. 2008; Tang et al. 2009), les neurones *ex vivo* présentent une sensibilité accrue à un stress oxydant. En effet, après traitement « aigu » ou « chronique » par la roténone (inhibiteur du complexe I) des cellules traitées par siOPA1, la mort cellulaire est plus importante que dans les conditions contrôles. Nous avons de plus observé que les défenses antioxydantes ne sont pas activées en réponse à ce traitement. En effet, la translocation de NRF2 augmente dans les cellules contrôles traitées par la roténone mais pas dans celles qui sont invalidées pour OPA1. De plus, les quantités protéiques de SOD1 et catalase restent stables voir diminuent après le traitement aigu à la roténone. Nous pouvons donc proposer que la

sensibilité des cellules à un stress oxydant soit la conséquence d'une saturation de la machinerie antioxydante, suite à la diminution d'OPA1. Ces résultats rappellent les travaux de Jin et collègues dans des cellules striatales modèles de la maladie de Huntington. Suite à un stress oxydatif induit par le t-BHQ (tert-butylhydro-quinone), les cellules qui expriment une forme délétère de la protéine huntingtin (Htt) ne présentent pas d'activité ARE, donc pas d'activation de la voie NRF2, contrairement aux cellules contrôles (Jin et al. 2013).

Dans notre cas, l'activation de NRF2 suite à la perte d'OPA1 ne semble pas induire la cible SOD2, ni en condition « basale » ni en présence de roténone. Or cette enzyme est directement impliquée dans la détoxification de l'anion superoxyde produit au niveau de la matrice mitochondriale par les complexes I, II et III. Sachant que d'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans la transactivation du gène codant SOD2, comme AP-2 et Sp1, ou l'inhibition de la transcription, comme Egr-1 (Porntadavity et al. 2001), nous pouvons donc supposer un autre mécanisme de régulation pour cette cible dans nos modèles. SOD2 semble être une cible intéressante car la déplétion de cette protéine par interférence à l'ARN (siRNA) chez les vers *C. Elegans* invalidés pour OPA1 (mutations ou siRNA) diminue drastiquement la taille de la progéniture, contrairement à l'extinction de SOD1 (Kanazawa et al. 2008). Comme en témoignent les données chez ce modèle invertébré de l'ADOA-1, analyser la régulation transcriptionnelle de SOD2 serait une piste de compréhension de l'étiologie de cette rétinopathie.

### **Un modèle de souris de l'ADOA-1 est dans un état pro-oxydant**

Une des souris modèles de l'ADOA-1, B6;C3-Opa1<sup>329-355del</sup> (*OPA1*<sup>+/-</sup>) (Alavi et al. 2007), est arrivée tardivement au cours de ma thèse dans le laboratoire. Je n'ai donc pas pu réaliser un grand nombre d'expériences sur ce modèle. Toutefois, les résultats indiquent clairement que les souris sont dans un état pro-oxydant à 4 mois, qui s'accroît à 10 mois. En effet, la diminution de l'activité de l'aconitase à 4 mois, accentuée à 10 mois, montre une augmentation des EAO intra-mitochondriaux avec l'âge, dans le cortex des souris mutantes. Nous pouvons suggérer, avec ces premiers résultats, que les souris *OPA1*<sup>+/-</sup> subissent un vieillissement prématuré. En effet, le vieillissement est généralement associé à une augmentation des radicaux libres, ce qui est le cas dans notre modèle de souris mutées (Sohal and Orr 2012).

Le vieillissement cellulaire s'accompagne également d'une diminution de la capacité antioxydante des cellules (Geremia et al. 1990). Nous avons relevé une diminution significative de la quantité protéique de SOD1 dans le groupe de souris mutées pour OPA1, en comparaison au groupe contrôle, à 4 mois. Une étude réalisée à partir de rétines de souris modèles de l'ADOA-1 (Alavi et al. 2007), les mêmes modèles murins que nous possédons au laboratoire, montre une diminution de

SOD2 (ARNm et protéine), à 9 mois (Nguyen et al. 2011). Les auteurs suggèrent également que la diminution de cette enzyme antioxydante pourrait participer à la mise en place d'un stress oxydant et, à terme, à la perte des cellules par apoptose, comme ils ont pu le démontrer par la méthode TUNEL. Bien que les isoformes de la superoxyde dismutase impliquées soient différentes selon le tissu (cortex ou rétine), une même voie de détoxification de l'anion superoxyde semble perturbée, en réponse à la diminution d'OPA1.

Toutefois, l'activité de la catalase et la quantité de SOD1 et de SOD2 augmentent de 4 à 10 mois chez les souris *OPA1<sup>+/-</sup>*. Pour analyser la théorie du vieillissement cellulaire précoce chez les souris *OPA1<sup>+/-</sup>*, nous souhaitons caractériser le statut antioxydant de souris sauvages et mutées au delà des 10 mois. En effet, la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine chez les souris mutantes commence au 13<sup>ème</sup> mois et des défauts locomoteurs sont visibles au 22<sup>ème</sup> mois. Nous pouvons donc proposer que des défauts des capacités antioxydantes soient visibles dès le début des symptômes chez la souris. Toutefois, bien que les défenses augmentent entre 4 et 10 mois chez les souris mutantes, celles-ci ne sont pas supérieures aux quantités et activités mesurées chez les souris contrôles. Cet argument nous laisse penser que « l'activation » des défenses entre 4 et 10 mois reste néanmoins inefficace pour détoxifier les cellules du cortex, chez les souris *OPA1<sup>+/-</sup>*, comme en témoigne la diminution de l'activité de l'aconitase.

Les premiers résultats montrent que les défenses antioxydantes sont insuffisantes pour tamponner les radicaux libres produits. Nous obtenons dans les cortex du modèle murin les mêmes résultats que dans les neurones *ex vivo* invalidés pour OPA1 et traités avec la roténone. En effet, nous n'observons pas d'augmentation des quantités de la catalase ni de SOD1 lors du traitement pro-oxydant, dans des neurones invalidés pour OPA1. Cependant, il est évident qu'à ce stade de nos études, nous ne pouvons écarter un rôle de la glie. Cette question doit être adressée afin de préciser son implication ou pas dans ce mécanisme de neurodégénérescence. Pour comprendre le mécanisme mis en jeu chez les souris *OPA1<sup>+/-</sup>* lors de leur vieillissement, de nombreuses autres expériences sont à envisager. En effet, les premières atteintes de la vision sont détectées à partir du 13<sup>ème</sup> mois chez la souris mutante et s'accroissent jusqu'au 24<sup>ème</sup> mois (Alavi et al. 2007). Ainsi, caractériser l'homéostasie redox dans des souris âgées permettrait de mieux comprendre la cause de la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, voire d'appréhender les autres symptômes extra-oculaires, comme les problèmes locomoteurs observés à 21 et 22 mois (Alavi et al. 2009). De même, analyser le statut antioxydant et le métabolisme oxydatif chez les souris jeunes et au stade embryonnaire fournirait des pistes essentielles pour comprendre la mise en place de la maladie de l'ADOA-1.

### **Le statut antioxydant de certains patients atteints d'ADOA-1 est affecté**

Comme dans nos modèles cellulaires et animaux, la perte de fonction d'OPA1, induite par des mutations chez les patients, serait responsable de la mise en place d'un état pro-oxydant au sein de la cellule. Malgré la faible cohorte de patients dont nous disposons au laboratoire, nous avons pu mettre en évidence trois groupes d'individus : 1) une population qui présente des défenses antioxydantes activées, tout comme dans nos modèles cellulaires, 2) des personnes qui expriment un niveau d'enzymes détoxifiantes comparable au groupe contrôle et 3) un groupe qui présente des réponses antioxydantes très faibles, notamment SOD1 et SOD2. D'après ces résultats, nous proposons des approches thérapeutiques ciblées pour les patients. En effet, l'ensemble de mes travaux de thèse a permis le dépôt d'un brevet européen le 27 mars 2014 (n°EP14305448) nommé ANTIOCHE (Les défenses antioxydantes, nouveau marqueur de pronostic et cibles thérapeutiques de l'ADOA-1) ou « Method, process and kit for prognosis of OPA1 gene or OPA1-gene product-deficit induced diseases ». Nous proposons aux industries pharmaceutiques de développer un « kit » pronostic permettant de déterminer le niveau des défenses antioxydantes et l'activité de l'aconitase (témoin des EAO intra-mitochondriaux) chez les patients atteints d'ADOA-1 à partir de biopsies de peau ou de prélèvements buccaux ou sanguins. Ces données peuvent être comparées aux résultats obtenus chez des volontaires sains au même âge que le patient ou au patient lui-même, si des analyses ont été effectuées auparavant. J'ai pu réaliser différents tests (nombre de cellules, concentration de l'échantillon...) pour déterminer l'activité de l'aconitase *in vitro* (Kit Biomérieux) à partir de fibroblastes issus de peau de patients ou de volontaires sains, mais sans aucun résultat exploitable jusqu'à présent. Le kit que nous utilisons couramment au laboratoire ne semble pas être efficace pour la mesure de l'activité de l'aconitase. Nous suggérons donc que certaines mises au point doivent être réalisées pour déterminer les conditions (ou le kit) optimales pour réaliser ce type de dosage.

Ainsi en fonction des résultats, différentes stratégies sont à envisager. Si le patient se présente dans le cas de figure 1), ses défenses antioxydantes sont capables de répondre au stress endogène (la perte de fonction d'OPA1) et aux stimuli exogènes (UVs, hypoxie). Nous proposons tout de même un suivi de ces personnes et un traitement préventif à base de molécules antioxydantes. De même, pour les personnes qui se comportent comme le groupe 2) et qui ont une activité de l'aconitase comparable au groupe contrôle, il n'est pas nécessaire d'entamer une thérapie antioxydante à ce moment là. Toutefois, si l'activité de l'aconitase dans ce cas de figure est diminuée, un traitement à l'aide de molécules antioxydantes « directes » (piégeurs d'EAO comme le glutathion, la vitamine E, la vitamine C) ou « d'ARE inducers » à visée « indirecte » (curcuminoïdes qui activent la voie de NRF2) doit être proposé. Enfin, le groupe 3) est à surveiller préférentiellement. En effet, si les

défenses antioxydantes basales sont faibles, ces individus doivent suivre un traitement approprié. Or, pour prescrire une molécule thérapeutique, nous devons comprendre l'origine du problème. En effet, dans notre cas de figure, ce sont les enzymes SOD1 et SOD2 qui sont faibles chez les quatre mêmes patients. Les cellules de patients peuvent-elles induire ces enzymes après une activation de la voie NRF2 par des « ARE inducers » ? Sinon, nous pouvons proposer d'analyser les gènes codants SOD1 et SOD2 par un séquençage : sont-ils des gènes modificateurs chez ces individus ? Si tel est le cas, il est inutile d'activer la voie de NRF2 car la transactivation de ces gènes ne sera pas suffisamment efficace pour tamponner les radicaux libres. Ainsi, une thérapeutique avec des molécules antioxydantes « directe » serait plus appropriée. De plus, 3 des 4 patients analysés présentent un syndrome « ADOA-1 plus » avec des atteintes extra-oculaires comme une ataxie ou une surdité. Les gènes modificateurs, comme SOD1 ou SOD2, peuvent constituer un facteur aggravant de la maladie, ce qui encourage d'autant plus la recherche de ces gènes. L'équipe prévoit à court terme de collaborer avec le Pr Pascal Reynier, au CHU d'Angers, pour le séquençage des gènes candidats à partir d'une plus grande cohorte de patients atteints d'ADOA-1. Nous pouvons également considérer que NRF2 pourrait être un gène modificateur de sévérité. En effet, des résultats préliminaires sur la translocation de NRF2 chez ces 4 patients indiquent que le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire du facteur de transcription est inférieur aux cellules contrôles chez l'un de ces patients.

Pour une partie des patients que nous avons analysés (groupe 3) qui ont entre 10 et 30 ans, nous pouvons suggérer que les cellules présentent des signaux de vieillissement précoce comme en témoignent les défenses antioxydantes faibles (Mammucari and Rizzuto 2010; Sohal and Orr 2012). J'ai pu réaliser plusieurs tests de dosage de l'activité de l'aconitase, pour déterminer indirectement la production d'anion superoxyde dans la mitochondrie, mais sans succès. Pour obtenir plus d'information sur le statut redox de ces cellules, l'utilisation des sondes roGFPs pourrait être plus appropriée (Lukyanov and Belousov 2014).

Enfin, les effets bénéfiques de la voie de signalisation de NRF2 ont fait l'objet de nombreuses études notamment sur des modèles *in vitro* ou *in vivo* de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Gan and Johnson 2013; Takaya et al. 2012; De Vries et al. 2008). Nous proposons que l'utilisation d'« ARE inducers » capables d'activer la voie de NRF2 constituerait une stratégie thérapeutique pour les patients atteints d'ADOA-1. De nombreuses molécules ont été répertoriées telles que le curcumin ou les dérivés curcuminoïdes (Eckert et al. 2013; Gupta et al. 2013; Jeong et al. 2009) qui ont été utilisés dans des essais cliniques pour de nombreuses pathologies comme les cancers (pancréas, colorectal, prostate), les maladies inflammatoires ou le diabète (Eckert et al. 2013; Gupta et al. 2013; Jeong et al. 2009). De façon surprenante, un travail très récent montre

l'implication de NRF2 dans un phénomène d'amplification du stress oxydant dans les cellules murines NIH 3T3 ou des fibroblastes humains (Zucker et al. 2014). En effet, des traitements oxydatifs très puissants par des radicaux oxygénés ou agents chimiques (peroxyde d'hydrogène, étoposide, paraquat) induisent la voie de signalisation de NRF2 directement responsable de la transcription de Klf9 (Kruppel-like factor 9), une protéine impliquée dans l'accumulation des EAO et par conséquent dans la mort cellulaire (Mannava et al 2012; Zucker et al. 2014). Ainsi, les doses des molécules antioxydantes à visées indirectes (par la voie de NRF2) doivent être très surveillées pour leur utilisation chez les patients atteints d'ADOA-1 ou d'autres maladies neurodégénératives.

## **L'identification des partenaires d'OPA1 permet une relecture de ses (dys)fonctions**

De nombreuses mises au point ont été réalisées afin de permettre une analyse correcte de l'échantillon par un spectromètre de masse de type Orbitrap. Nous avons donc choisi de réaliser des enrichissements mitochondriaux à partir de neurones corticaux matures et fonctionnels, d'immunoprécipiter la protéine OPA1 et ses partenaires, et de déposer le contenu de l'échantillon dans un gel SDS-PAGE afin d'obtenir une meilleure séparation des candidats selon leur masse moléculaire. L'expérience a été répétée 3 fois à l'identique.

Les résultats des expériences de protéomique ouvrent de nouvelles pistes d'études pour la compréhension des fonctions d'OPA1 et permettent donc d'appréhender au mieux ses dysfonctions. Certaines protéines identifiées par cette approche ont été précédemment décrites dans la littérature et ne feront donc pas l'objet de nos recherches par la suite, comme les Mitofusines 1 et 2 (Guillery et al. 2008) ou la Mitofiline (Darshi et al. 2011). De plus, nous avons également relevé la présence de différentes sous-unités des complexes I (NDUS1), III (Core 1), IV (COX2) et V ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , O) de la chaîne respiratoire. Zanna C. et collaborateurs ont montré une interaction d'OPA1 avec les sous-unités NDUF9 (complexe I), une sous-unité de 70kDa (complexe II) et la sous-unité Core 2 (complexe III) dans des extraits issus de fibroblastes humains (Zanna et al. 2008). Nous ne détectons donc pas les mêmes sous-unités que dans cette étude mais nous pouvons nuancer cette différence car nous avons identifié la plupart des sous-unités des complexes seulement dans une des trois expériences de protéomique.

Les trois expériences de protéomique nous ont permis d'identifier deux nouveaux partenaires potentiels d'OPA1 : l'aconitase et l'Hexokinase 1 (HK1). La mise en évidence de la

présence de l'aconitase dans un macro-complexe avec OPA1 renforce le lien déjà démontré entre la dynamine et le métabolisme oxydatif, car cette enzyme a un rôle clé dans le cycle de Krebs. La présence d'OPA1 ne semble pas nécessaire pour la stabilité de l'enzyme car la quantité de l'aconitase est stable dans les cellules HeLa et les neurones invalidés pour OPA1. Néanmoins, dans ces conditions, l'activité de l'enzyme est diminuée. Cette diminution se justifie principalement par une oxydation de l'enzyme par l'anion superoxyde produit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, comme en témoigne la littérature (Koo et al. 2005; Tretter et al. 2011). Nous retrouvons également dans une des trois expériences la malate déshydrogénase, une autre enzyme du cycle de Krebs, comme interagissant potentiel d'OPA1. L'activité de cette enzyme n'est pas affectée par la diminution de la quantité d'OPA1 dans les cellules HeLa. Ainsi, la perte d'OPA1 ne semble pas perturber la stabilité de ces deux enzymes du cycle de Krebs. Une autre hypothèse concernant le lien entre OPA1 et l'aconitase vient du modèle levure. En effet, des travaux réalisés par Chen XJ et collaborateurs ont montré l'interaction entre l'aconitase et l'ADN mitochondrial (simple et double brins) dans la levure *S. Cerevisiae*, de façon indépendante de l'activité catalytique de l'enzyme (Chen et al. 2007; Chen et al. 2005). Le rôle de l'aconitase dans le maintien du génome mitochondrial n'a jamais été montré dans des cellules de mammifères jusqu'à présent, mais nous pouvons envisager un mécanisme similaire chez les eucaryotes supérieurs. En effet, l'interaction d'OPA1 avec l'aconitase pourrait être en lien avec son rôle dans le maintien de l'ADN mitochondrial (Elachouri et al. 2011). Nous proposons de réaliser des ChIP-seq (Chromatine ImmunoPrecipitation followed by massively parallel sequencing) sur l'ADN mitochondrial, comme cela a déjà été réalisé avec la protéine TFAM, à partir d'extraits de cellules HeLa (Wang et al. 2013). En effet, nous pourrions récupérer la protéine OPA1 ou l'aconitase avec des anticorps de bonne qualité et vérifier le site de liaison à l'ADN, si ce dernier a été immunoprécipité.

Comme nous l'avions exposé précédemment, la présence d'OPA1 dans un macro-complexe comprenant la Mitofiline a déjà été démontrée par co-immunoprécipitation dans des cellules HEK293 (Darshi et al. 2011). Le rôle de la protéine OPA1 dans la jonction des crêtes peut être en lien direct avec le complexe MINOS (Mitochondria Inner Membrane Organizing System) dont la protéine Mitofiline est un des constituants majeurs (Bohnert et al. 2012). De plus, MINOS interagit avec les machineries d'import des protéines mitochondriale TOM et SAM. Nous avons également retrouvé dans notre analyse de protéomique les protéines TOM70 et SAM50. Ces données suggèrent fortement qu'OPA1 pourrait s'associer avec le complexe MINOS par ses interactions avec les partenaires cités. L'implication d'OPA1 dans ce complexe permettrait (i) la structuration des crêtes mitochondriales, un rôle déjà attribué à la dynamine et (ii) la régulation de l'import des protéines mitochondriales qui pourrait être une toute nouvelle fonction de la dynamine.



Nous avons pu retrouver dans 2 des 3 expériences de protéomique la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase et dans l'expérience 3, trois autres sous-unités ( $\gamma$ ,  $\delta$  et OSCP). D'après les résultats obtenus dans les cellules HeLa et les neurones, la quantité de la sous-unité  $\gamma$  (ATP5C1) n'est pas affectée par la diminution d'OPA1 par interférence à l'ARN. Ainsi, l'interaction entre OPA1 et l'ATP synthase ne semble pas être nécessaire pour la stabilité de l'enzyme mais pourrait être importante pour son oligomérisation. En effet, la perte d'OPA1 induirait une déstabilisation des homocomplexes d'ATP synthase de manière indirecte, par la déstructuration des crêtes, et/ou par la perte d'interaction « directe » entre la dynamine et l'enzyme. La dimérisation ou oligomérisation de l'ATP synthase a déjà été décrite comme essentielle dans la courbure de la membrane interne et la jonction des crêtes (Allen et al. 1995; Paumard et al. 2002; Thomas et al. 2008; Wagner et al. 2010). Nous pouvons donc proposer que l'interaction entre OPA1 et l'ATP synthase formerait un nouveau complexe multi-protéique nécessaire à la jonction des crêtes mitochondriales, indépendamment de MINOS.

La troisième protéine retrouvée dans les 3 expériences de protéomique est l'Hexokinase I (HK1) qui phosphoryle le glucose en Glc-6-P. L'hexokinase, qui constitue donc la première enzyme de la glycolyse, est présente sous 4 isoformes, HK1 étant l'isoforme neuronale. 75 à 90 % de l'enzyme est associée à la membrane externe des mitochondries, le reste est cytosolique (Lynch, Fogarty, and Fay 1991). Cette enzyme interagit avec VDAC1, un canal de la membrane externe mitochondriale (Rosano 2011). De plus, cette interaction est sensible au statut métabolique de la cellule et varie en fonction du taux de glucose disponible (Hutny and Wilson 2000; Lynch et al. 1991). En présence de glucose, HK1 est lié à VDAC, qui lui-même interagit avec le canal ANT (Adenine Nucleotid Translocator) (Regenold et al. 2012). Ce multi-complexe permet un meilleur rendement énergétique pour la cellule car l'ATP produit par la phosphorylation oxydative est exporté de la mitochondrie *via* l'association des canaux ANT/VDAC1, puis utilisé par HK1 pour phosphoryler le glucose. Ainsi, les produits de cette réaction, le Glc-6-P et l'ADP, sont respectivement utilisés pour la glycolyse et pour la phosphorylation oxydative. Nous avons, de plus, identifié les protéines VDAC1, 2 et 3, ainsi que l'ANT2 dans une des trois expériences d'interactome. Ces résultats, qui restent à valider, suggèrent un rôle prépondérant d'OPA1 dans ce complexe multi-protéique. De plus, j'ai pu confirmer la présence d'HK1 après immunoprécipitation d'OPA1 (n=3). Sachant qu'OPA1 est une protéine de la membrane interne et que l'hexokinase 1 n'est présente à la membrane externe mitochondriale que par son interaction avec VDAC1, nous n'envisageons pas une association directe entre les deux protéines. Clairement, des protéines « intermédiaires » permettent cette interaction, et nous supposons que ANT et VDAC pourraient remplir ce rôle. De plus, nous avons réalisé une analyse « Ingenuity Pathway Analysis » (logiciel Ingenuity) entre OPA1 et l'Hexokinase 1 qui suggère une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines et VDAC1. De nombreuses autres protéines ont

été proposées comme ayant des liens entre nos deux partenaires et pourraient aider à la compréhension de la mécanistique intracellulaire qui découle de cette association en multi-complexe. Si l'existence de ce multi-complexe est caractérisée, quel est l'intérêt fonctionnel d'une telle organisation ? La présence d'OPA1 pourrait permettre de coupler la glycolyse, par son association avec HK1, au métabolisme oxydatif mitochondrial, par son impact sur la phosphorylation oxydative, comme nous l'avons précédemment décrit.

L'ensemble de ce travail, bien que préliminaire, met en avant l'intérêt d'analyser les partenaires d'OPA1 pour comprendre sa fonction au sein du métabolisme oxydatif et de la jonction des crêtes. De plus, de nouvelles fonctions pourraient être attribuées à la dynamine comme son rôle bien qu'indirect, dans la glycolyse.

## **La maturation neuronale est affectée suite à la diminution de la protéine OPA1**

La morphologie globalement filamenteuse des mitochondries que nous retrouvons dans des neurones *ex vivo* a déjà été mise en évidence dans différents types de neurones en culture et *in vivo* dans diverses structures cérébrales (Chang and Reynolds 2006; Li and Schild 2007; Popov et al. 2005; Uo et al. 2009; Voccoli and Colombaioni 2009). Les observations réalisées pour ce travail se sont limitées dans un premier temps aux zones proximales des dendrites. Grâce à l'utilisation de chambres de culture microfluidiques, mises en place depuis peu au laboratoire, nous analyserons la morphologie et le fonctionnement des mitochondries dans le compartiment axonal. En effet, cette technologie permet d'ensemencer les neurones dans une chambre, leurs axones pouvant s'engager dans des canaux aboutissant à une seconde chambre qu'ils colonisent (Kilinc et al. 2010; Magnifico et al. 2013). L'analyse du chondriome spécifique des axones offre un lien direct avec la pathologie de l'ADOA-1. En effet, les patients atteints de cette rétinopathie présentent principalement une neurodégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Ces neurones ont une morphologie particulière car ils présentent de longs axones, avec une partie coudée au niveau du nerf optique et une zone démyélinisée, qui pourrait participer à l'étiologie de cette pathologie (Carelli et al. 2004). Dans nos conditions, l'extinction de la protéine OPA1 dans les neurones corticaux provoque, comme attendu, la fragmentation des mitochondries (Griparic et al. 2004; Olichon et al. 2003; Song et al. 2007). La masse des mitochondries est altérée dans tous les compartiments des neurones transfectés par les siOPA1 (dendrites et axones).

Comme dans notre modèle de culture primaire de neurones *ex vivo*, l'hyperfilamentation transitoire des mitochondries au cours de la maturation précède un processus de différenciation dans de nombreux types cellulaires tels qu'une lignée de neuroblastes immortalisés (Voccoli and Colombaioni 2009), des myoblastes (De Palma et al. 2010), des cellules souches embryonnaires (Chang and Reynolds 2006), et des neurones (Wilkerson and Sankar 2011). Ainsi, la morphologie fusionnée des mitochondries pourrait être un critère de différenciation cellulaire, phénomène qui requiert des changements métaboliques comme une augmentation de la production d'ATP (Gomes and Scorrano 2011). La perte de la protéine fusogène OPA1 entraîne par conséquent l'absence du phénomène d'hyperfilamentation transitoire dans les neurones corticaux *ex vivo*. Ainsi, un défaut de maturation neuronale se met en place comme en témoigne l'altération de la synaptogenèse observée au 9<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour de culture des neurones invalidés pour OPA1. En effet, la diminution d'OPA1 induit une réduction de la quantité de protéines spécifiques des éléments pré- et post-synaptiques et une diminution du nombre de synapses. Ceci suggère un rôle de la protéine OPA1 dans le processus de synaptogenèse. De plus, l'extinction d'OPA1 induit un retard de la mise en place de l'arborescence dendritique, significatif dès le 9<sup>ème</sup> jour de culture. Nos résultats sont en accord avec des travaux qui montrent que l'inactivation de DRP1 *in vitro* ou *in vivo* (souris *DRP1<sup>+/-</sup>*) provoque une diminution du nombre de synapses et également du nombre d'épines dendritiques (Li et al. 2008; Li et al. 2004; Wang et al. 2009; Ishihara et al. 2009). Une autre étude met en évidence que la surexpression d'une forme mutée dominante négative de DRP1 dans des neurones hippocampiques en culture primaire, n'interfère pas avec la croissance neuritique mais influence la synaptogenèse (Li et al. 2004). De plus, une diminution de chacun des acteurs de la dynamique mitochondriale, excepté FIS1, entraîne une diminution du nombre d'épines dendritiques dans des neurones corticaux en culture primaire (Wang et al. 2009).

De façon concomitante avec le pic d'hyperfilamentation transitoire des mitochondries, le potentiel de membrane mitochondrial augmente, en association avec une élévation transitoire du taux intracellulaire d'EAO et la translocation au noyau du facteur de transcription NRF2. Dans notre modèle cellulaire, l'augmentation du taux d'EAO serait en aval de l'hyperfilamentation, démontré par l'absence d'effet du traitement antioxydant à DIV6 sur la morphologie mitochondriale. Nous proposons donc que l'hyperfilamentation induit une augmentation transitoire de l'activité de la chaîne respiratoire, comme en témoigne l'augmentation du potentiel de membrane, et donc de la quantité d'EAO. Sachant que les EAO peuvent agir comme des seconds messagers, il n'est pas rare de les retrouver en amont d'une voie de signalisation responsable de la différenciation neuronale (Prozorovski et al. 2008; Suzukawa et al. 2000; Tsatmali et al. 2005). Cette signalisation pourrait être responsable de l'activation de la voie du facteur de transcription NRF2 (Min et al. 2011), déjà montré

comme important dans la différenciation neuronale dans des souris déficientes pour le gène *NRF2* et des lignées cellulaires PC12 (Kosaka et al. 2010; Zhao et al. 2009). L'hyperfilamentation mitochondriale transitoire dans des neurones *ex vivo* permettrait la mise en place d'une signalisation impliquant *NRF2* qui pourrait entraîner la maturation des neurones par l'induction de cibles qui restent à caractériser, comme cela a déjà été démontré dans les adipocytes (Seo and Lee 2013) ou les ostéoclastes (Kanzaki et al. 2013). En absence de la dynamine OPA1, la signalisation induite par l'hyperfilamentation mitochondriale serait perdue.

Ainsi, alors que *DRP1* influence la mise en place des synapses par son rôle sur la distribution des mitochondries (Li et al. 2004), l'effet d'OPA1 pourrait être lié à une perturbation du métabolisme oxydatif mitochondrial associé à un défaut de distribution de la masse mitochondriale. La perte de la protéine OPA1 modifierait donc le processus d'hyperfilamentation entraînant une diminution de la phosphorylation oxydative se traduisant par une perturbation de la signalisation redox et de la synaptogenèse.

## Impacts de ces travaux sur la compréhension de la pathogenèse de l'ADOA-1

Les premières observations menées sur des patients atteints de la pathologie de l'ADOA-1 ont décrit une altération spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). La découverte plus récente de formes syndromiques de cette pathologie a permis d'élargir le tableau clinique et de révéler des atteintes multiples du système nerveux central comme une altération du nerf auditif et l'apparition de lésions cérébrales accompagnées, chez certains patients, de problèmes musculaires (Yu-Wai-Man et al. 2010). Ainsi, les dysfonctions d'OPA1 se révèlent cruciales non seulement pour les cellules ganglionnaires mais également pour d'autres types cellulaires.

Nos investigations dans des modèles cellulaires (cellules HeLa, neurones, fibroblastes de patients) et animaux (souris) de l'ADOA-1 ont permis de mettre en évidence pour la première fois un mécanisme moléculaire et cellulaire commun. En effet, la perte de fonction de la dynamine (interférence à l'ARN ou mutations du gène) induit un défaut de l'activité mitochondriale et une activation des défenses antioxydantes, principalement impliquées dans la voie de détoxification de l'anion superoxyde. De plus, l'induction d'un stress oxydatif exogène augmente la mort cellulaire, probablement par l'incapacité des neurones à mettre en place une réponse antioxydante supplémentaire. La dérégulation de l'homéostasie redox consécutive à la diminution d'OPA1 pourrait

être responsable des défauts de maturation neuronale, notamment de la synaptogenèse, que nous observons. Nous suggérons donc que les cellules des patients atteints d'ADOA-1 sont dans un état de vieillissement précoce, qui pourrait s'aggraver au fil du temps et de l'environnement (UVs, hypoxie) et être responsable de la neurodégénérescence observée chez les patients. Les neurones, du fait de leur morphologie et de leur forte consommation énergétique, sont plus sensibles à des dysfonctions mitochondriales, comme l'illustrent les nombreuses maladies neurodégénératives associées à des défauts mitochondriaux. En définitive, la compréhension des fonctions d'OPA1 dans la maturation neuronale et la régulation de l'homéostasie redox pourrait aider à mieux aborder l'ADOA-1, mais aussi d'autres rétinopathies telles que la maladie de Leber (LHON) ou le glaucome, ou des pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer.

Enfin, l'ensemble des résultats que j'ai pu générer pendant ma thèse servira de support, en plus des données de la littérature, à la mise en place d'un projet de modélisation mathématique de la pathologie de l'ADOA-1 dans l'équipe. En effet, des projets de modélisations mathématiques de pathologies ont déjà été réalisés pour la maladie de Parkinson (Poliquin et al. 2013) et pour des stratégies thérapeutiques pour le virus du SIDA (Mhawej et al. 2008). L'objectif est de modéliser un processus intracellulaire chez les patients en fonctions de plusieurs paramètres comme la respiration cellulaire, la production d'ATP, le taux d'EAO intracellulaire, l'activité de l'aconitase, l'état des défenses antioxydantes (quantités, activités), etc. Ainsi, en fonction des atteintes cellulaires, nous pourrions avoir des indications sur leurs effets dans le temps, et proposer des traitements individualisés.

# Conclusion Générale

# CONCLUSION GENERALE

---

Notre travail a permis de confirmer et d'approfondir les mécanismes par lesquels l'inactivation d'OPA1 induit une perturbation du métabolisme oxydatif mitochondrial et par voie de conséquence un déséquilibre de l'état redox. Nous avons montré pour la première fois que la perte d'OPA1 induit une perturbation de la réponse antioxydante, incapable d'être activée lors d'un stress oxydatif exogène. De plus, nous avons pu mettre en évidence que dans les différents types cellulaires modèles de l'ADOA-1 analysés (cellules HeLa et neurones), la voie de détoxification de l'anion superoxyde semble impliquée. La perte d'OPA1 conduirait donc à des dysfonctions de l'homéostasie redox : les cellules sont dans un état pro-oxydant. Ce processus pourrait être responsable d'un vieillissement cellulaire précoce qui, à terme, induirait la dégénérescence des cellules des patients, principalement les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). En effet, ces neurones sont particulièrement sensibles à des troubles de l'apport en oxygène, ont un axone très long qui possède une partie démyélinisée et qui de ce fait, demande une grande quantité d'énergie pour la conduction du message nerveux. En plus de leur sensibilité à un défaut métabolique, ces neurones sont confrontés à des agressions extérieures comme les UV qui sont susceptibles d'engendrer un stress oxydant pouvant entraîner leur dégénérescence (Lenaers et al., 2009). De ce fait, l'association de stress oxydatifs à une perturbation de l'état redox provoquée par la diminution de la quantité de la protéine OPA1, comme nous l'avons montré, devrait conduire les neurones à la dégénérescence. Mes travaux de thèse ont donc permis le dépôt d'un brevet d'invention pour le pronostic et la thérapeutique de l'ADOA-1.

Grâce à l'étude sur des modèles cellulaires, ces travaux ouvrent des pistes de compréhension des mécanismes moléculaires induits par la perte d'OPA1. Nous proposons à présent d'approfondir les voies métaboliques mises en jeu dans un organisme intégré que sont les souris modèles de la pathologie de l'ADOA-1. De plus, nous pouvons étendre les mécanismes moléculaires que nous avons mis en avant à d'autres maladies neurodégénératives qui présentent, au cours du vieillissement, des défauts métaboliques et oxydatifs de la mitochondrie. De plus, l'analyse de l'interactome d'OPA1 révèle de nombreux nouveaux partenaires qui permettront également de préciser les rôles de la protéine dans la morphologie et les fonctions mitochondriales, mais également les dysfonctions retrouvées dans la pathologie de l'ADOA-1.

# Matériels et Méthodes



---

# MATERIELS ET METHODES

---

## I. Culture Cellulaire

### I. 1. Culture et transfection de cellules HeLa

Les cellules HeLa, lignée établie d'un adénocarcinome du col utérin, proviennent de *l'American Type Culture Collection* (USA).

#### La culture cellulaire

- Décongélation des ampoules de cellules HeLa

Les ampoules de cellules sont conservées dans un container à azote liquide. Les cellules congelées sont resuspendues avec du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/L glucose (DMEM, Invitrogen), supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10 %) et des antibiotiques (pénicilline 100unités/mL et streptomycine 0,1 mg/mL), préalablement chauffé à 37°C. Puis les cellules sont centrifugées à 120 g pendant 6 minutes et à 25°C. Le culot cellulaire est repris dans du milieu et les cellules ont été placées dans une boîte de pétri de 10cm de diamètre (P100) mise ensuite à l'incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

- Maintien de la culture

A 70-80 % de confluence maximum, les cellules sont rincées dans du PBS 1X et décollées avec 400 µL de trypsine pendant 5 minutes à 37°C. Puis elles sont resuspendues dans du milieu chaud après avoir été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Le nombre de passages des cellules n'excède pas 25.

- Congélation de cellules HeLa

Les cellules sont décollées à l'aide de la trypsine, comptées et centrifugées à 120 g pendant 6 minutes à 25°C. Le culot de cellules est repris dans un milieu de congélation (90 % de sérum de veau fœtal et 10 % DMSO). Les cellules sont ensuite mises dans une boîte de congélation au -80°C et transférées dans de l'azote liquide.

#### Transfection de cellules HeLa par électrolocation

Les cellules HeLa ont été transfectées avec le kit « Cell line kit R » (Amaxa) par des siARNs contrôles (D-001210-02, Dharmacon Research, siContrôles) ou dirigés contre l'ARN messager d'OPA1 (D-005273-03, AAAGAAGGCUGUACCGUUA, Dharmacon Research, siOPA1) en suivant les recommandations des fournisseurs (1,5 µg de siARN pour 1 million de cellules) et en utilisant le programme I-013.

## I. 2. Culture de fibroblastes humains

Les fibroblastes sont issus de biopsies de peau de personnes saines (contrôles) ou de patients atteints d'ADOA-1. Ces cellules proviennent d'un don de l'équipe du Pr Pascal Reynier du CHU d'Angers.

### La culture cellulaire

Les conditions de culture des fibroblastes de patients sont les mêmes que celles utilisées pour les cellules HeLa. Toutefois, le nombre de passages de ces cellules n'excède pas 15.

## I. 3. Culture primaire et transfection de neurones corticaux embryonnaires de rats (E17)

Les neurones corticaux sont prélevés sur des embryons au stade E17 issus de rates Wistar gestantes. Les animaux sont maintenus dès leur arrivée dans une pièce éclairée 12 heures par jour, à la température de 22°C et disposent d'eau et de nourriture à volonté.

### La culture cellulaire

- Recouvrir les boîtes de culture 24h avant la mise en culture des cellules

Pour permettre l'adhérence des neurones, les boîtes de culture sont incubées avec de la poly-D-lysine (Sigma, PM 30000-70000, P7280) diluée à la concentration de 1X final dans du PBS 1X.

- Dissection des embryons

Les rates sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (100 mg/kg). L'abdomen est incisé, les deux cornes utérines sorties puis les sacs vitellins extraits. Les fœtus sont prélevés, les têtes sectionnées et rincées dans du PBS-glucose (6 g/L) à 4°C. La dissection

des cortex est effectuée sous loupe binoculaire dans du PBS-glucose (6 g/L) à 4°C puis les cortex sont transférés dans une quantité minimale de PBS à 4°C (environ 10 cortex par tube Falcon 15 mL).

- Mise en culture

Une dissociation enzymatique du tissu est réalisée à l'aide d'une solution de papaïne (10U/mL) dans du PBS 1X pendant 15 minutes à 37°C, sans agitation. La réaction est stoppée par addition d'une solution de DNase (200U/mL) et de B27 (1X) dans du PBS-glucose, 5 minutes à température ambiante. A l'aide d'une pipette, une dissociation mécanique est réalisée grâce à une dizaine d'« aller-retour ». La suspension cellulaire, une fois trouble, est filtrée (filtres 70 µM) puis déposée sur coussin de BSA stérilisée par des filtres de 20 µM (80 mg/mL repris dans du Neurobasal) et centrifugée à 120 g pendant 10 minutes à température ambiante. Chaque culot est repris dans 5 mL milieu complet.

Avant ensemencement, les boîtes de cultures préalablement recouvertes avec de la poly-D-lysine sont rincées avec du PBS 1X. Les cellules sont comptées avec une cellule de Malassez, ensemencées à 400 000 cellules par mL (600 000 cellules par boîte P35) et placées dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

- Les solutions, milieux et réactifs

- PBS sans Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> + (Eurobio CS1PBS01-01)
- D-(+)-Glucose 45 % (Sigma G8769, 450 g/L)
- Papaïne (Sigma, P4762)
- DNase (Invitrogen, 18047-019, 200U/mL)
- BSA (culture grade, Sigma A8806-5 g)

**Milieu de culture :**

- Neurobasal A-25 (Invitrogen, 10888-022)
- Antibiotiques (Penicillin/Streptomycin 10000U/mL, SigmaP0781)
- Antifongique (Fongizone 250U/mL, Invitrogen 15290-50 mL)
- Acide L lactique (Sigma L1750), 0,9 mg/mL H<sub>2</sub>O final
- B27 serum-free supplement 50x (Invitrogen, 17504-44)
- Glutamine 1 mM final (Invitrogen 25030-024)

## **Transfection des neurones par électrolocation**

Les neurones sont transfectés avec le kit « Rat Neurons » (Amata) par des siARNs contrôles (D-001210-02, Dharmacon Research, siContrôle) ou dirigés contre l'ARN messager d'OPA1 (D-086996-02, GAUUGUGCCUGACUUUAUA, Dharmacon Research, siOPA1) en suivant les recommandations des fournisseurs et en utilisant le programme G-013. Cinq millions de cellules sont transfectées avec 3 µg de si et réparties après électrolocation, et ajout de 500 µL de milieu chaud, dans 3 boîtes P35 et mises à l'incubateur à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. La moitié du milieu de culture est changé 2h minimum après transfection.

## II. Dissections et microdissections d'organes de souris

### II. 1. Dissection et microdissection de la rétine de souris adulte

#### Dissection de l'œil

Les paupières sont coupées (micro-ciseaux) tout autour de l'œil. A l'aide d'une seringue, l'œil est rincé avec PBS 1X froid afin de le débarrasser des poils. Les attaches derrière le globe oculaire sont sectionnées (conjonctive, nerf optique) en faisant attention de ne pas toucher le sinus veineux derrière l'œil. Le globe est ensuite placé dans une boîte de pétri remplie de PBS 1X froid.

#### Microdissection de la rétine

L'œil est déposé dans une goutte de PBS 1X sous une loupe binoculaire (fond noir). Pour débiter la microdissection, le globe est maintenu par les adhérences encore présentes. Une première incision au niveau de l'œil est réalisée à l'aide d'une aiguille fine, pour traverser la cornée. Le contour de l'œil est découpé avec les micro-ciseaux pour détacher le cristallin. La rétine est désormais visible et se détache facilement du reste de l'œil. C'est un feuillet blanchâtre fragile donc il faut la retirer avec précaution. Une partie de l'iris peut rester attachée à la rétine (tissus noir). Elle doit être retirée pour isoler seulement la neuro-rétine. La rétine est récupérée, placée dans un tube et aussitôt congelée dans l'azote liquide. Elle peut être conservée au -80°C.

### II. 2. Dissection d'organes de souris adulte

#### Le cortex cérébral

Après avoir retiré la peau de la boîte crânienne, l'os est découpé à la base du crâne en remontant vers le museau, en faisant attention de ne pas endommager le cortex sous-jacent. La calotte crânienne est ensuite retirée de façon à mettre les 2 hémisphères à nu. Le cerveau est décollé délicatement de la boîte crânienne puis placé côté dorsal vers le haut. Le cervelet est retiré du reste à l'aide de pinces fines. Ensuite, le cerveau est retourné face ventrale pour dérouler les hémisphères du centre vers l'extérieur. Les hippocampes sont visibles sous forme d'amas allongés : ils sont séparés du cortex. En utilisant les branches des pinces (pas les pointes), la base inférieure du cortex est raclée doucement, de façon à éliminer le thalamus et la matière blanche riche en myéline. Cette étape est très délicate car les hémisphères ont tendance à se disloquer. Enfin, retourner les hémisphères pour vérifier qu'ils forment une petite tranche amincie et homogène de surface lisse et un peu rosée. Les placer dans des tubes et les congeler aussitôt dans de l'azote liquide. Le cortex peut ainsi être conservé à -80°C.

### **Dissection de certains organes périphériques**

L'animal est placé sur le ventre pour effectuer une incision sur le haut du dos. A l'aide de cette incision, retirer la peau de la souris jusqu'au bout des pattes arrières. Le **tissu adipeux blanc sous-cutané** se trouve soit au niveau des cuisses, soit sous la peau. Il est retiré délicatement à l'aide de pinces et de petits ciseaux et conservé dans un tube immédiatement congelé. Ensuite, **les quadriceps (muscles glycolytiques)** sont sectionnés et de même congelés aussitôt après dissection. Une incision est réalisée au niveau du mollet de la souris et le muscle est retiré pour accéder au **muscle oxydatif** de couleur rouge. Enfin, au dessus des omoplates de l'animal se trouvent deux tissus sombres : **le tissu adipeux brun**. Il est retiré et nettoyé du tissu adipeux blanc alentour.

L'animal est ensuite retourné côté ventral. La peau est incisée puis entièrement découpée pour isoler dans un premier temps les gonades et récupérer le **tissu adipeux péri-gonadique**. Enfin, le gros lobe du **foie** puis le **cœur** sont récupérés et congelés comme les autres organes.

### III. Analyses de la chaîne respiratoire mitochondriale et du cycle de Krebs

#### III. 1. Respiration cellulaire par la technique Seahorse Biosciences

La respiration cellulaire est analysée dans deux types cellulaires : les neurones en culture primaire et les cellules HeLa respectivement transfectées avec un siContrôle ou un siOPA1. L'appareil de mesure de consommation d'oxygène est le « XF24 Extracellular Flux Analyser » et le kit utilisé est « XF Cell Mito Stress Test Kit » (101706-100, Seahorse Biosciences).

##### Ensemencement des cellules dans la plaque Seahorse (plaque « bleue »)

La plaque estensemencée avec 300 000 neurones transfectés par puits (coatés 24h avant avec de la poly-D-lysine) ou 15 000 cellules HeLa transfectées par puits (20 puits/24). Les puits A1, B2, C4 et D6 ne sont pasensemencés (seulement du milieu de culture) et servent de contrôle négatif. Pour optimiser l'ensemencement, les cellules sont déposées au fond du puits dans une goutte de 50 µL puis incubées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> pendant environ 1h. Puis, 200 µL de milieu sont ajoutés à chaque puits.

Les analyses sont réalisées 72h après transfection et mise en culture des cellules HeLa et à DIV6 pour les neurones transfectés.

##### Préparation de la plaque de mesure (plaque « verte ») 24h avant analyse

Il est impératif d'hydrater la plaque de mesure avec 1 mL de « Calibrant » par puits. Cette plaque est incubée dans une étuve à 37°C, sans CO<sub>2</sub>. Un b cher d'eau stérile est placé à côté de la plaque pour créer un milieu humide.

##### Les mesures de respiration cellulaire au « Seahorse »

Avant la mesure de la respiration, le plaque « verte » est maintenue dans le « Calibrant » dans une étuve à 37°C sans CO<sub>2</sub>. Le milieu de mesure a été préparé à l'avance et chauffé à 37°C : DMEM (D5030-1 L, Sigma), NaCl (143 mM, S9625, Sigma), rouge de phénol (3 mg/mL), glucose (10 mM, G8769, Sigma), L-glutamine (2 mM, G6392-1VL, Sigma) et pyruvate (2 mM, P5280, Sigma), à pH 7,4.

- Préparation de la plaque « bleue »

Les puits de la plaque « bleue » sont rincés 2 fois avec le milieu de mesure (environ 800  $\mu\text{L}$  par puits et par lavage). Ensuite, exactement 550  $\mu\text{L}$  de milieu de mesure est déposé dans chaque puits et la plaque est incubée à 37°C dans une étuve sans  $\text{CO}_2$ , pendant environ 1h.

- Préparation de la plaque « verte »

Pendant ce temps, faire le calcul des volumes de drogues à ajouter spécifiquement par « micro-puits » de la plaque « verte ». Chaque puits de la plaque dispose de 4 « micro-puits » autour de la sonde pour déposer le volume de drogue requis.

Le plan des zones des « micro-puits » sur la plaque « verte » : **D C**  
**B A**

L'ordre d'injection des drogues dans le milieu de culture des cellules lors de la mesure est de A à D. Les drogues utilisées sont fournies avec le kit et reprises dans du DMSO à une concentration initiale de 25 mM.

**Tableau récapitulatif de la concentration finale des drogues**

Les drogues	Neurones	HeLa
<b>A : Oligomycine</b>	0,6 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>B : FCCP</b>	6 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>C : Roténone</b>	50 nM	1 $\mu\text{M}$
<b>+ Antimycine</b>	0,182 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$

*FCCP : Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*

Les drogues sont déposées dans les « micro-puits » 10 fois plus concentrées que la concentration finale désirée. Pour la zone A, 55  $\mu\text{L}$  de drogue est déposé car elle est éjectée dans 550  $\mu\text{L}$  de milieu de culture, lors de la mesure. Pour la zone B il faut prévoir 60  $\mu\text{L}$  et la zone C 65  $\mu\text{L}$ . La zone D n'a pas été utilisée lors des expériences.

- Programmation de l'appareil Seahorse et mesures

Un protocole a été mis au point pour nos types cellulaires : l'appareil effectue 3 à 4 mesures par « état respiratoire », avant l'ajout de drogues et après chaque drogue injectée. Une fois les paramètres déterminés, la plaque « verte » est insérée (attention au sens qui dépend du code barre) dans l'appareil suivi de la plaque bleue pour débiter l'enregistrement de la consommation d'oxygène.

Les activités respiratoires mesurées sont normalisées sur la quantité de protéines déterminée par la technique de Bradford.

### III. 2. Mesure de l'activité des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les dosages des activités des 4 premiers complexes de la chaîne ont été effectués à partir de culots de cellules HeLa transfectées par siOPA1 ou siContrôle. Les complexes I et III ont été dosés par Dr Christine Demeilliers (Université Joseph Fourier, Grenoble) et l'activité des complexes II et IV a été mesurée par Virginie Agier et Dr Anne Lombès (Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris).

#### **Dosage du complexe I (Christine Demeilliers, Université Joseph Fourier, Grenoble)**

- Principe du dosage

Le complexe I de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  et le transfert les électrons du NADH au coenzyme Q. Son activité est donc évaluée par la disparition du NADH qui absorbe à 340 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe I est le coenzyme Q10 ou ubiquinone. Cette molécule très hydrophobe est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, plus hydrophile.

Les autres activités cellulaires (non respiratoires) d'oxydation du NADH sont insensibles à la roténone, un inhibiteur de complexe I. L'oxydation du NADH est donc mesurée avant (pendant 2 minutes) et après l'ajout de roténone dans la cuve.

- Méthode utilisée

Après décongélation du culot de cellules (2 millions), les cellules sont resuspendues dans 205  $\mu\text{L}$  de tampon Kpi 50 mM pH 7,5 froid. Puis les cellules sont recongelées dans de l'azote liquide et décongelée au bain marie à 37°C, deux fois pour permettre une lyse complète de l'échantillon.

L'activité du complexe I est déterminée par l'oxydation du NADH à 340 nm. Le milieu réactionnel comprend 855  $\mu\text{L}$  de tampon KPi 50mM pH 7,5 chaud, 10  $\mu\text{L}$  de NADH 10 mM, et un million de cellules. Après calibration de la lecture à 340 nm, à 37°C sur l'air, la réaction est déclenchée par ajout de 5  $\mu\text{L}$  de décylubiquinone 20 mM et la Do est lue pendant 2 minutes sans roténone, puis 2 minutes après ajout de 5  $\mu\text{L}$  de roténone 2 mM. L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité en présence de roténone sur l'activité de base en



$\mu\text{moles/min/million}$  de cellules en utilisant le coefficient d'extinction pour le NADH ( $\epsilon=6.22 \text{ mmole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). L'activité a été rapportée à la quantité de protéines en mg (dosage Bradford).

### **Dosage du complexe II** (Virginie Agier et Anne Lombès, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris)

- Principe du dosage

Le complexe II de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les électrons au coenzyme Q10 ou ubiquinone. Ces électrons sont ensuite transmis à un accepteur artificiel, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP). L'ubiquinone très hydrophobe est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone beaucoup plus hydrophile. L'activité est mesurée en suivant la réduction du DCPIP à 600 nm. L'oxydation de l'ubiquinone par le complexe III est inhibée par l'antimycine et le flux réverse des électrons vers le complexe I est inhibé par la roténone. Une ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert d'électrons au DCPIP.

- Méthode utilisée

Le milieu de réaction utilisé est composé de 25 mM K Phosphate pF 7,5, 20 mM succinate, 100  $\mu\text{M}$  décylubiquinone, 50  $\mu\text{M}$  DCPIP, 1 mM KCN, 5  $\mu\text{M}$  roténone, 12,5  $\mu\text{g/mL}$  antimycine A, 100  $\mu\text{M}$  ATP, 2 mg/mL BSA. Dans une cuve de mesure, 976  $\mu\text{L}$  de milieu de réaction sont dosés avec 40  $\mu\text{g}$  de protéines cellulaires, préalablement homogénéisés. Après calibration de la lecture à 600 nm, à 37°C sur l'air, une ligne de base est lue pendant 3 minutes puis la réaction est déclenchée par ajout de 4  $\mu\text{L}$  de 25 mM de décylubiquinone. L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base en nmoles/min/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction pour le DCPIP ( $\epsilon=19,1$ ).

### **Dosage du complexe III** (Christine Demeilliers, Université Joseph Fourier, Grenoble)

- Principe du dosage

Le complexe III de la chaîne respiratoire permet l'oxydation de l'ubiquinol (forme réduite de l'ubiquinone) et le transfert des électrons au cytochrome c. La réduction du cytochrome c induit une augmentation de l'absorbance à 550 nm. Des activités cellulaires non respiratoires induisent aussi l'oxydation de l'ubiquinol. Ainsi, l'activité spécifique du complexe III est calculée par la différence entre l'activité totale et celle en présence d'antimycine A.

- Méthode utilisée

Après décongélation du culot de cellules (2 millions), les cellules sont resuspendues dans 205  $\mu\text{L}$  de tampon Kpi 90,7 mM pH 7,5 froid. Puis les cellules sont recongelées dans de l'azote liquide et décongelée au bain marie à 37°C, deux fois pour permettre une lyse complète de l'échantillon.

La décylubiquinone est réduite chimiquement par du dithionite. Le milieu réactionnel contient 105,6  $\mu\text{M}$  de décylubiquinol, 100  $\mu\text{M}$  de cytochrome c, 100 mM de  $\text{KPO}_4$  pH 7,5, 50  $\mu\text{M}$  d'EDTA, 1 mM de cyanure de potassium et 1 mg/mL d'albumine bovine. L'inhibition du complexe III est effectuée avec 5  $\mu\text{g/mL}$  d'antimycine A. Après calibration de la lecture à 550 nm, à 30°C sur l'air, la réaction est déclenchée par ajout de 8  $\mu\text{L}$  de décylubiquinol et la Do est lue pendant 3 minutes, pour les deux cuves avec ou sans antimycine A. L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité en présence d'antimycine A sur l'activité de base en  $\mu\text{moles/min/million}$  de cellules en utilisant le coefficient d'extinction pour le cytochrome c ( $\epsilon=18.5$ ).

### **Dosage du complexe IV** (Virginie Agier et Anne Lombès, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris)

- Principe du dosage

Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c, son activité est donc évaluée par la diminution de l'absorbance à 550 nm du cytochrome c réduit. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

- Méthode utilisée

Deux solutions de référence sont préparées : la solution de cytochrome c « 100 % réduit » et la solution « 100 % oxydée ». La solution 100 % oxydée est préparée avec quelques grains de ferricyanure de potassium (la solution est orange sombre). La solution 100 % réduite est obtenue avec quelques grains de dithionite de sodium (bisulfite) (la solution est rose saumon). La solution utilisée pour le dosage est réduite progressivement à 550 nm avec quelques  $\mu\text{L}$  de la solution 100 % réduite. Le but est d'atteindre une réduction de 90-95 % calculée sur l'écart entre l'absorbance des 2 solutions 100 %. Le milieu de réaction utilisé est composé de 25 mM K phosphate pH 7,0, 50  $\mu\text{M}$  de cytochrome c réduit et 20  $\mu\text{g}$  de protéines. La lecture de la Do est déclenchée par l'ajout de la préparation cellulaire après calibration initiale sur l'air à 37°C, à 550 nm. L'activité spécifique est calculée en nmoles/min/ mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction pour le cytochrome c ( $\epsilon=18,5$ ).

### III. 3. Dosage des ROS intracellulaires totaux avec la sonde H<sub>2</sub>-DCFDA

La sonde dichlorohydrofluorescéine diacétate (H<sub>2</sub>-DCFDA) permet la détection des ROS totaux dans la cellule (mitochondrie et cytoplasme). Cette sonde diffuse à travers la membrane des cellules puis est clivée dans le cytosol par des estérases pour donner du dichlorohydrofluorescéine (H<sub>2</sub>-DCF). La forme clivée réagit avec les espèces actives de l'oxygène (ROS) pour donner du dichlorofluorescéine (DCF), une forme fluorescente de la molécule excitable à 493 nm et qui est détectée à 527 nm.

#### Ensemencement des cellules HeLa

Le dosage des ROS est effectué dans des cellules HeLa transfectées avec du siContrôle ou du siOPA1. Le dosage est réalisé à partir de 5 boîtes de 60mm de diamètre (P60) « avec sonde » et 4 boîtes « sans sonde » (contrôle) par condition à analyser. Chaque boîte P60 estensemencée avec 300 000 cellules HeLa transfectées.

#### Incorporation de la sonde dans les cellules

A l'abri de la lumière, la sonde est incorporée (4 µM final) directement dans le milieu de culture des cellules HeLa, trois jours après transfection. Les boîtes P60 contrôles sont incubées avec du DMSO (4 µM final), le véhicule de la sonde. Pour éviter toute toxicité du véhicule, 40 µL de volume « sonde » ou « DMSO » sont systématiquement ajouté à chaque milieu. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 30 minutes précises puis posées sur glace. Les cellules sont rincées au PBS 1X puis mises à « sec », congelées à -80°C, et conservées plusieurs jours.

#### Dosage fluorimétrique des ROS

Pour doser les ROS, les cellules sont mises à température ambiante pendant 30 minutes environ puis grattées dans 300 µL d'eau stérile. 200 µL sont récupérés pour le dosage et mis dans une plaque 96 puits noire et conservés à 4°C. Le reste de l'échantillon sert pour le dosage protéique en microplaque. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre WALLAC VICTOR 1480 et lues à 493 nm.

### III. 4. Dosage de l'ATP intracellulaire

#### Technique colorimétrique

Le dosage d'ATP a été réalisé par colorimétrie avec un kit commercial (ab83355, Abcam) à l'aide d'un autre kit pour la précipitation des protéines (ab93299, Abcam). L'ATP a été dosé dans des cellules HeLa déplétées ou non pour OPA1 par interférence ARN. Ce protocole s'est avéré inefficace pour doser l'ATP dans les neurones.

- Ensemencement des cellules HeLa

Après transfection d'un million de cellules HeLa avec un siContrôle ou un siOPA1, les cellules sont ensemencées dans trois boîtes P60 et réparties de manière égale. 72h après transfection des cellules et mise en culture, deux boîtes sont utilisées pour le dosage de l'ATP et la troisième est grattée et les cellules congelées pour vérifier l'extinction de la protéine OPA1 par immunoblot.

- Préparation des solutions

- **ATP Probe (tube rouge)** : à dissoudre avec 220 µL de DMSO anhydre (conserver à -20°C).
- **ATP Converter (tube bleu)** : à dissoudre avec 220 µL d'ATP Assay Buffer (conserver à -20°C).
- **Developer Mix (tube vert)** : à dissoudre avec 220 µL d'ATP Assay Buffer (conserver à -20°C).
- **ATP Standard (tube jaune)** : à dissoudre avec 100 µL d'eau distillée pour générer un stock de 10 mM (conserver à -20°C).

- Le dosage en microplaque 96 puits

- Préparation de l'échantillon pour le dosage

Les cellules sont lavées avec du PBS 1X froid. Puis le culot de cellules « fraîchement » grattées est repris dans 100 µL d'ATP Assay Buffer. 10 µL de la solution sont conservés pour le dosage de protéines de type Bradford. Les protéines de l'extrait sont précipitées en suivant les instructions du fournisseur du kit « Deproteinizing Sample Preparation Kit » (ab93299, Abcam). Après ajout de 18,2 µL de PCA dans le tube et agitation par vortex, les cellules lysées sont maintenues dans la glace pendant 5 minutes et centrifugées à 13000 g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré (environ 90 µL) et 3,75 µL de solution de neutralisation sont ajoutés dans le tube maintenu dans la glace pendant 5 minutes, puis centrifugé une dernière fois pendant 1 minute.

- Préparation de la gamme étalon

La solution d'ATP Standard est diluée dans de l'eau distillée au 1mM final. Deux gammes, réalisées avec 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µL de la solution d'ATP diluée, sont déposées dans les puits. Le volume final est ajusté à 50 µL avec de l'eau distillée. Pour faire une estimation de la quantité d'ATP dans les échantillons, les deux gammes sont moyennées.

➤ **Le dosage**

Chaque échantillon est dosé en double: 45  $\mu$ L sont prélevés pour mettre dans un puits de microplaque et 45  $\mu$ L de la même préparation dans un deuxième puits. 5  $\mu$ L d'eau distillée sont ajoutés à chaque puits pour ajuster le volume final à 50  $\mu$ L.

Pour un puits, la solution d'ATP Reaction Mix est préparée avec 44  $\mu$ L d'ATP Assay Buffer, 2  $\mu$ L d'ATP Probe, 2  $\mu$ L d'ATP Converter et 2  $\mu$ L de Developer mix. Après ajout du Mix dans les puits qui contenaient les échantillons et les gammes, la microplaque est incubée pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, la Do est lue à 570 nm. Les données sont analysées pour présenter le taux d'ATP en mM par  $\mu$ g de protéines.

### **Technique de bioluminescence**

Le dosage d'ATP et d'ADP a été réalisé par une technique de bioluminescence luciférine luciférase. L'ATP a été dosé dans des neurones déplétés ou non pour OPA1 par interférence ARN. Le dosage a été réalisé par Dr Anne Devin (IBGC, Bordeaux).

➤ Ensemencement des cellules HeLa et des neurones

Un million de cellules HeLa transfectées avec un siContrôle ou un siOPA1 sontensemencées dans une boîte P100. Les cellules sont récupérées pour le dosage 72h après transfection. Cinq millions de neurones sont transfectés avec un siContrôle ou un siOPA1 et égalementensemencés dans une boîte P100. Les neurones sont récupérés pour le dosage d'ATP et d'ADP 6 jours après transfection.

➤ Préparation des cellules avant le dosage

Les neurones sont rincées puis grattées dans du PBS 1X froid et centrifugées à 600g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot de cellules est ensuite repris dans 200  $\mu$ L de tampon d'extraction préparé extemporanément ( $T_{ex}$  : 7 % PCA, 25 mM EDTA). Un volume x de KOMO (2 M KOH, 0,5 M MOPS) est ajouté à l'échantillon pour équilibrer le pH de l'extrait à environ 6. En effet, l'ATP est plus stable à pH 6 que 7. La quantité de KOMO nécessaire (environ 190  $\mu$ L) pour l'équilibration à pH 6 doit être déterminée auparavant avec 200  $\mu$ L de  $T_{ex}$  seul. Un précipité de  $KClO_4$  se forme alors et l'extrait est centrifugé pendant 2 minutes à 14 000 rpm, à 4°C. Le surnageant est conservé et congelé à -80°C (ATP et ADP sont stables) après avoir contrôlé le pH. Le procédé d'extraction doit être réalisé rapidement sinon l'ATP s'effondre.

➤ Dosage

Pour mesurer l'ATP, 20 à 50 µL d'échantillon sont dosés dans 200 µL de tampon bioluminomètre (tris-acetate 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 7,75) et 20 µL de ATP Monitoring Reagent (luciférine-luciférase). En parallèle, une gamme étalon (1 à 10 µL d'ATP Standard 10 µM) est réalisée.

Pour déterminer le taux d'ADP, un volume x d'échantillon (à déterminer) est incubé 30 minutes avec du PEP (0,5 mM), 2 µL de pyruvate kinase diluée au 1/10<sup>ème</sup> (2 µg) et du tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (75 mM), MgSO<sub>4</sub> (15 mM). Le principe est de coupler la réaction catalysée par l'enzyme pyruvate kinase (PEP + ADP → pyruvate + ATP) et le dosage de l'ATP. Cette technique nous donne alors le taux d'ATP + ADP. L'ADP est donc déterminée par la formule : (ATP + ADP) – ATP.

### III. 5. Mesure de l'activité d'enzymes du cycle de Krebs

Les dosages des activités de trois enzymes du cycle de Krebs ont été effectués à partir de culots de cellules HeLa transfectées par siOPA1 ou siContrôle. Les activités ont été mesurées *in vitro* par Dr Anne Lombès et Virginie Agier à l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris.

#### Dosage de l'activité de la citrate synthase

- Principe du dosage

La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA. Le CoA réduit (CoA-SH) formé lors de la réaction réagit avec le 5,5'-dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm. Une ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert.

- Méthode utilisée

Le milieu réactionnel est composé de 100 µM DTNB, 100 mM Tris HCL pH 8,0, 300 µM acétyl-CoA, 500 µM oxaloacétate, 0,1 % Triton X-100 et 40 µg de protéines cellulaires. La lecture de la réaction est réalisée pendant 4 minutes à 37°C à 412 nm, après une calibration initiale sur l'air. La réaction est déclenchée avec 50 µL de 10 mM d'acide oxaloacétique dans 100 mM Tris HCL pH 8,0. L'activité spécifique est calculée en nmoles/min/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction pour le TNB ( $\epsilon=13,6$ ).

#### Dosage de l'activité de la fumarase

- Principe du dosage

La fumarase catalyse l'hydratation du fumarate en L-malate qui est une réaction réversible. En présence de malate, la fumarase produit du fumarate absorbant à 250 nm. L'activité de la fumarase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance de l'acide fumarique à 250 nm. Une ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire la réaction spontanée de transfert.

- Méthode utilisée

Le milieu de réaction est composé de 100 mM  $\text{KPO}_4$  pH 7,4, 50 mM malate, 60  $\mu\text{g}$  de protéines cellulaires. Dans une cuve de mesure, 930  $\mu\text{L}$  de milieu de réaction sont dosés avec 60  $\mu\text{g}$  de protéines cellulaires, préalablement homogénéisés. Après calibration de la lecture à 250 nm, à 37°C sur l'air, une ligne de base est lue pendant 5 minutes puis la réaction est déclenchée par ajout de 50  $\mu\text{L}$  de 1 M malate dans 500 mM  $\text{KPO}_4$  pH 7,4. L'activité spécifique est calculée en nmoles/min/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction pour l'acide fumarique ( $\epsilon=2,44$ ).

### **Dosage de l'activité de la malate déshydrogénase**

- Principe du dosage

La malate déshydrogénase catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate, couplée à la réduction du  $\text{NAD}^+$  en NADH.

- Méthode utilisée

Le milieu de réaction est composé de 50 mM sodium phosphate, 5 mM trisodium DL-isocitrate et 60  $\mu\text{g}$  de protéines cellulaires. Dans une cuve de mesure, 965  $\mu\text{L}$  de milieu de réaction sont dosés avec 60  $\mu\text{g}$  de protéines cellulaires, préalablement homogénéisés. Après calibration de la lecture à 240 nm, à 37°C sur l'air, une ligne de base est lue pendant 5 minutes puis la réaction est déclenchée avec 5  $\mu\text{L}$  de 1 M isocitrate. L'activité spécifique est calculée en nmoles/min/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction pour l'isocitrate ( $\epsilon=3,6$ ).

### **Dosage de l'activité de l'aconitase**

L'aconitase est une enzyme du cycle de Krebs dont l'activité est inhibée par l'anion superoxyde (oxydation de l'enzyme). L'aconitase catalyse la conversion entre le citrate et l'isocitrate. La mesure de l'activité de l'aconitase est réalisée de manière indirecte par le dosage du NADPH. En effet, le NADPH est formé lors de la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. Ainsi, plus l'aconitase est active, plus il y a aura de NADPH produit.

L'activité de l'aconitase a été déterminée à l'aide d'un kit (Bioxitech, 21041) et mesurée par spectrophotométrie à partir d'un lysat de cellules HeLa et de neurones, déplétés ou non pour OPA1 par interférence ARN.

- Dosage colorimétrique

Les échantillons sont lysés dans 250 µL de la solution Assay Buffer à l'aide d'un « Tissue Lyser » (Qiagen) (2 minutes à 25 battements par minutes). L'activité de l'aconitase est mesurée dans une cuve contenant 200 µL d'échantillon lysé, 200 µL de Substrat, 200 µL de NADP Reagent et 200 µL d'Enzyme. Le reste de l'échantillon est utilisé pour le dosage des protéines en microplaques. La Do est lue à 340 nm pour les échantillons, le zéro (Assay Buffer à la place de l'échantillon) et le contrôle positif, du foie de souris (Foie lysé à la place de l'échantillon), pendant 40 minutes à 37°C.

- Analyse des données

Après avoir réalisé le graphique de la Do en fonction du temps de lecture, la pente de la droite est déterminée ( $Do_{16min} - Do_{15min} \dots$ ) sur un certain nombre de points et la moyenne des valeurs est calculée. L'activité de l'aconitase est calculée selon la formule suivante : **(Moyenne des Do)/(2,4435 x 6,22 x 0,001 x quantité de protéines en µg) x 4**. L'activité est exprimée en milli unité d'enzymes par µg de protéines.

### III. 6. Dosage du NADH, H<sup>+</sup> et du NAD<sup>+</sup>

Le dosage du taux de NADH, H<sup>+</sup> et du NAD<sup>+</sup> intracellulaire a été réalisé par colorimétrie avec un kit commercial (ab65348, Abcam). Le taux de NADH, H<sup>+</sup> et NAD<sup>+</sup> a été mesuré dans des cellules HeLa déplétées ou non pour OPA1 par interférence ARN.

#### Ensemencement des cellules HeLa

Après transfection de 3 millions de cellules HeLa avec un siContrôle ou un siOPA1, les cellules sontensemencées dans trois boîtes P60 et réparties de manière égale. 72h après transfection des cellules et mise en culture, deux boîtes sont utilisées pour le dosage et la troisième boîte est grattée et les cellules congelées pour vérifier l'extinction de la protéine OPA1 par immunoblot.

#### Préparation des solutions (à conserver au -80°C)

- **NADH Standard** : à dissoudre avec 200 µL de DMSO anhydre.



- **NAD Cycling Enzyme Mix** : à dissoudre avec 220  $\mu\text{L}$  de NAD Cycling Buffer.
- **NADH Developer** : à dissoudre avec 1,2 mL d'eau distillée.

### Le dosage en microplaque 96 puits

- Préparation de l'échantillon pour le dosage

Les cellules (deux boîtes P60) sont lavées avec du PBS 1X froid. Puis les deux culots de cellules « fraîchement » grattées sont repris dans 400  $\mu\text{L}$  de NADH/NAD Extraction Buffer et lysés à l'aide de deux cycles « chaud/froid » (un cycle : 20 minutes sur de la carboglace – 10 minutes à température ambiante). Les tubes sont agités par vortex et centrifugés à 14 000 rpm pendant 5 minutes puis les surnageants qui contiennent le NADH et le NAD sont récupérés. 10  $\mu\text{L}$  de la solution sont conservés pour le dosage de protéines par la technique Bradford.

#### *Optionnel*

Pour éliminer les enzymes susceptibles de dégrader le NADH pendant la durée du dosage, les surnageants sont transférés dans des tubes avec une membrane de 10kDa (Microcon, MRCPT010, Millipore) et centrifugés à 30 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons ainsi filtrés ne contiennent plus d'enzymes.

- Préparation de la gamme étalon

La solution de NADH Standard est diluée au 1/100<sup>ème</sup> dans la solution NADH/NAD Extraction Buffer pour obtenir 10  $\mu\text{M}$  final. Deux gammes, réalisées avec 0, 2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{L}$  de la solution NADH Standard diluée, sont déposées dans les puits. Le volume final est ajusté à 50  $\mu\text{L}$  avec la solution NADH/NAD Extraction Buffer. Pour faire une estimation de la quantité de NADH dans les échantillons, les deux gammes sont moyennées.

- Le dosage

Chaque échantillon est dosé en duplicate : 40  $\mu\text{L}$  sont prélevés pour mettre dans un puits de microplaque et 40  $\mu\text{L}$  de la même préparation dans un deuxième puits. Les échantillons ainsi déposés permettent de déterminer le taux de NAD total ou NADt (NADH et NAD).

Pour détecter le NADH « seul », le NAD doit être décomposé : 200  $\mu\text{L}$  de l'échantillon extrait sont prélevés et chauffés à 60°C pendant 30 minutes. Puis, cet échantillon chauffé est déposé dans les puits en duplicate également (40  $\mu\text{L}$ /puits).

Les volumes des puits contenant les différents échantillons sont ajustés à 50  $\mu\text{L}$  final avec de la solution NADH/NAD Extraction Buffer.

Pour un puits, la solution de NAD Cycling Mix est préparée avec 98  $\mu\text{L}$  de NAD Cycling Buffer Mix et 2  $\mu\text{L}$  de NAD Cycling Enzyme Mix et ajoutée à chaque puits contenant les échantillons et les gammes. La microplaque est incubée pendant 5 minutes à température ambiante pour convertir le NAD restant en NADH. Puis 10  $\mu\text{L}$  de NADH Developer sont ajoutés à chaque puits pour enclencher le début de la réaction. La Do est lue à 450 nm. Les données sont analysées pour présenter le taux de NADH,  $\text{H}^+$  et de  $\text{NAD}^+$  en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines ainsi que le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$ . Le taux de NAD est déterminé par la formule suivante :  $\text{NAD} = \text{NADt} - \text{NADH}$ .

## IV. Mesure du lactate extracellulaire, témoin de l'activité glycolytique

Le dosage du lactate a été réalisé à partir du surnageant de culture de cellules HeLa transfectées par un siOPA1 ou un siContrôle, à l'aide d'un kit (Lactate PAP 61192, Biomérieux) en suivant les recommandations du fournisseur. Les réactifs du kit contiennent du phénol donc le dosage a été effectué sous une hotte chimique.

### Ensemencement des cellules HeLa

Un million de cellules HeLa sont transfectées par un siOPA1 ou un siContrôle puisensemencées dans une boîte 10cm de diamètre (P100). Le taux de lactate extracellulaire est dosé trois jours après la transfection.

### Le dosage

400  $\mu\text{L}$  du surnageant de culture sont dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  pour le dosage. 10  $\mu\text{L}$  de cette dilution sont dosés avec 990  $\mu\text{L}$  de la solution R3 (extemporanément, reprendre le tube noté R3 avec 10 mL de la solution R2) après 5 minutes d'incubation à température ambiante. 1 mL de la solution R3 est dosé pour faire le zéro et 10  $\mu\text{L}$  de la solution R1 reprise avec 990  $\mu\text{L}$  de la solution R3 servent de point de référence (3mM de lactate). L'ensemble des échantillons est dosé en duplicat et lus, avec le zéro et le point de référence, à 505 nm.

Les cellules adhérentes ainsi que les cellules dans le surnageant de culture sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les taux de lactate mesurés (en mM) sont ensuite rapportés pour un million de cellules.

## V. Analyses de molécules antioxydantes : enzymes ou piègeurs d'EAO

### V. 1. Dosage du glutathion réduit et oxydé

Dr Anne Galinier, de l'équipe du Dr Louis Casteilla (StromaLab, Inserm1031 UMR5273, CHU Rangueil, Toulouse), a réalisé la mesure des formes réduites (GSH) et oxydées (GSSG) du glutathion. Le rapport des taux de glutathion réduit sur les taux de glutathion oxydé participe à la caractérisation du statut redox de la cellule.

La mesure est réalisée par une technique de chromatographie différentielle sur colonne (HPLC sur le plasma). La phase mobile passe dans la colonne qui sépare les différentes molécules. Les molécules passent une par une dans une cellule de détection électrochimique, ce qui permet un comptage des électrons sur chaque molécule (la captation des électrons labiles), qui dépend de l'état d'oxydo-réduction. Nous obtenons ainsi une représentation de 2 pics (surface/nombre d'électrons). Le premier pic correspond au glutathion réduit et le second au glutathion oxydé.

#### Dosage

Le dosage a été réalisé à partir de culots de cellules HeLa et de neurones transfectés par un siOPA1 ou un siContrôle.

Les culots secs de cellules sont déprotéinisés par ajout de 200  $\mu$ L d'acide métaphosphorique et agités par vortex pendant 1 minute. Les cellules sont centrifugées pendant 3 minutes et le surnageant est récupéré pour le dosage du glutathion. 50  $\mu$ L d'eau stérile sont ajoutés au surnageant puis l'échantillon est soniqué jusqu'à complète solubilisation et passé sur colonne HPLC. Le dosage de protéines est réalisé en parallèle (avant la déprotéinisation).

## V. 2. Mesure de l'activité superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme de la machinerie antioxydante qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde avec l'eau pour donner une autre espèce radicalaire, le peroxyde d'hydrogène. La SOD est présente dans la cellule sous deux isoformes : SOD1 (Cu/Zn-SOD) qui est cytoplasmique et dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et SOD2 (Mn-SOD) localisée dans la matrice mitochondriale. SOD3 (Cu/Zn-SOD) est une isoforme extracellulaire.

Le principe du dosage repose sur la propriété d'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'EDTA, réaction inhibée par la SOD. Le dosage est basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par les ROS et de leur dismutation par la SOD. Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50 % de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions de dosage.

### Détermination du volume de pyrogallol nécessaire pour le dosage

La Do du pyrogallol à 420 nm doit être de 0,022 maximum, dans le tampon Tris-DTPA. Cette absorbance maximum représente le 0 % d'inhibition. Ainsi, la Do de 1,9 mL de tampon est lue avec 30 à 50  $\mu$ L de pyrogallol (10 mM). La lecture est effectuée exactement 45 secondes après agitation de la cuve par retournement et pendant 2 minutes. Le volume nécessaire de pyrogallol (volume x) est relevé et sera le même tout le long du dosage.

### Préparation de la gamme avec la SOD bovine

La SOD bovine est reprise avec un tampon Tris-acide cacodylique 50mM/DTPA 1 mM (Tris-DTPA) (Sigma) à une concentration finale de 75 unités/mL. Puis elle est extraite avec une solution de Chloroforme/Ethanol (3 volumes de Chloroforme pour 5 volumes d'éthanol) par une centrifugation de 20 minutes à 4000 rpm, à 4°C. Le surnageant est récupéré et sert pour le dosage.

Puis la SOD bovine est diluée dans le Tampon Tris-DTPA (dans la glace) comme suivant :

Dilution	1/100	1/50	1/20	1/10	1/8	1/4	3/8
Tampon ( $\mu$ L )	396	392	380	360	350	300	150
SOD ( $\mu$ L )	4	8	20	40	50	100	90

La Do est mesurée pour 50 µL de SOD bovine à chaque dilution, dans 1,9 mL de Tris-DTPA et le volume x de pyrogallol. A chaque mesure, la cuve est homogénéisée par retournement et lue exactement 45 secondes après le début de la réaction, pendant 2 minutes.

### Dosage des échantillons

Le dosage a été réalisé à partir de culots de cellules HeLa transfectées avec siContrôle ou siOPA1. L'activité de la SOD n'a pas pu être déterminée dans les neurones. Les cellules HeLa sont lysées dans 250 µL de la solution Assay Buffer (kit du dosage de l'activité de l'aconitase, Bioxitech) à l'aide du « tissue lyser » (Qiagen) (2 minutes à 25 battements par minutes).

Trois dosages sont réalisés par échantillon dans 1,9 mL de Tris-DTPA et le volume x de pyrogallol : 1) 20 µL d'échantillon, 2) puis 15 µL (3/4) et enfin 3) 10 µL (1/2). Avant chaque mesure, les cuves sont homogénéisées par retournement et la lecture débute 45 secondes après l'ajout de l'échantillon, et pendant 2 minutes à 420 nm. Les trois dosages sont répétés autant de fois que d'échantillons à analyser.

### Analyse des données

Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du pyrogallol est déterminé pour chaque point de la gamme standard (SOD bovine) selon la formule suivante :  **$((Do \text{ du pyrogallol} - \Delta Do \text{ sur 2 minutes de lecture}) / Do \text{ du pyrogallol}) \times 100$** . La droite représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des dilutions de la gamme est tracée et l'IC<sub>50</sub> (inhibition à 50 %) est déterminé. L'activité de la SOD est déterminée en unité enzymatique est rapportée à la quantité de protéines (dosage de Bradford) en mg.

## V. 3. Mesure de l'activité catalase

La catalase est une enzyme de la machinerie antioxydante qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène. Le dosage consiste en la mesure de l'oxygène dégagé lors de la réaction dans un échantillon en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'activité de la catalase a été mesurée par spectrophotométrie à partir d'un lysat de cellules HeLa et de neurones, déplétés ou non pour OPA1 par interférence ARN.

### Dosage colorimétrique

Les cellules sont lysées dans 100 µL de la solution Assay Buffer (kit du dosage de l'activité de

l'aconitase, Bioxitech) à l'aide du « Tissue Lyser » (Qiagen) (2 minutes à 25 battements par minutes). La mesure de Do est lue à partir de 1 mL d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (19mM final) diluée dans du PBS 1X et de 20 µL d'échantillon lysé ajouté après 60s de lecture à 240 nm. La Do est mesurée à 25°C pendant 4 minutes toutes les 20 secondes. Le reste de l'échantillon est utilisé pour le dosage des protéines en microplaques.

### Analyse des données

Après avoir réalisé le graphique de la Do en fonction du temps de lecture, la pente de la droite ( $\Delta Do$ ) est déterminée sur les 4 à 6 derniers points de la courbe. L'activité de la catalase est calculée selon la formule suivante :  $\Delta Do \times 1000 / (43,6 \times 0,9 \times 20 \mu L \times 0,001 \times \text{quantité de protéines en } \mu g)$ . L'activité est exprimée en µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposées par minute et par mg de protéines.

## VI. Utilisation de la roténone comme traitement de stress oxydant exogène sur les neurones

Les neurones traités siOPA1 ou siContrôle ont été incubés en présence de roténone pour déterminer l'impact de la drogue sur la viabilité cellulaire et sur l'état des défenses antioxydantes.

### VI. 1. Traitement aigu à la roténone

Après 6 jours de culture (DIV6), les neurones sont incubés à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> avec 500 nM ou 1 µM de roténone pendant 1h. Le milieu de culture est remplacé à moitié par le milieu contenant la drogue diluée. Ensuite, le milieu est éliminé puis les cellules sont incubées avec du milieu reconditionné (ayant été le milieu de culture de neurones avant le traitement à la roténone) pendant 3h à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.

Les cellulesensemencées dans des boîtes de 35 mm de diamètre (P35) sont grattées, lavées au PBS et congelées à -80°C. Les culots de cellules sont utilisés pour des analyses par immunoblot.

Les neurones,ensemencés dans des plaques 24 puits (200 000 cellules par puits), sont traités au Bleu Trypan pour déterminer la viabilité cellulaire.

## VI. 2. Traitement chronique à la roténone

Après 6 jours de culture (DIV6), les neurones sont incubés à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> avec 50 nM ou 100 nM de roténone pendant 24 et 48h. Le milieu de culture est remplacé à moitié par le milieu contenant la drogue diluée.

Les neurones, ensemencés dans des plaques 24 puits (200 000 cellules par puits), sont traités au Bleu Trypan pour déterminer la viabilité cellulaire à chaque temps d'incubation.

## VI. 3. Viabilité cellulaire déterminée par le Bleu Trypan

La viabilité cellulaire est mesurée par un test d'exclusion au Bleu Trypan (Sigma). Le tapis cellulaire est rincé deux fois dans du PBS 1X puis incubé 2'30min avec du Bleu Trypan dilué dans du PBS 1X (0,2 %).

Le nombre de cellules « bleues » (mortes) et de cellules « blanches » (vivantes) est compté dans plusieurs champs et la viabilité est déterminée selon le rapport suivant : **(nombre de cellules blanches/(nombre de cellules blanches + nombre de cellules bleues)) x 100**.

## VII. Immunocytofluorescence cellulaire

### VII. 1. Immunocytofluorescence indirecte dans des cellules HeLa

#### Protocole d'immunocytofluorescence

Les cellules HeLa sont ensemencées dans des boîtes de culture P100, contenant des lamelles en verre, après transfection avec un siContrôle ou un siOPA1. 72h après transfection, les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis fixées avec 3,7 % de Formaldéhyde diluée dans du PBS 1X et incubées à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X et perméabilisées avec une solution de PBS 1X, 0,25 % Triton X-100 pendant 5 minutes à température ambiante.

*Pour visualiser le facteur de transcription NRF2, il est nécessaire de réaliser une étape de perméabilisation supplémentaire au méthanol (-20°C) pendant dix minutes.*

Ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X et saturées pendant 15 minutes à température ambiante avec une solution de PBS 1X, 3 % BSA. Puis, les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C avec les anticorps primaires dilués dans du PBS 1X, 3 % BSA. Après trois lavages pendant 5 minutes dans du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant 45 minutes à température ambiante avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X, 3 % BSA, à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules sont lavées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X. Pour marquer les noyaux, les cellules sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante avec du Hoechst dilué dans du PBS 1X (0,5 mg/mL) puis les lamelles sont rincées une fois au PBS 1X et une fois avec de l'eau stérile avant d'être montées sur lame avec du Mowiol.

Les observations sont réalisées avec un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 80i) ou confocal (Zeiss 710 Big) et les images sont acquises avec NIS-Element (Nikon Digital Sight DSU2 camera) ou le logiciel ZEN 2011 puis traitées avec le logiciel Image J.

### **Les anticorps primaires et secondaires utilisés**

**Anticorps primaires** : anti-NRF2 (Santa Cruz Biotechnology 1/50<sup>ème</sup>), anti-OXPHOS (Mitosciences 1/50<sup>ème</sup>) et anti-HSP60 (Sigma 1/100<sup>ème</sup>).

**Anticorps secondaires** : anti-souris et anti-lapin Alexa 594 et/ou 488 (Molecular Probes, 1/800<sup>ème</sup>).

## **VII. 2. Immunocytofluorescence indirecte dans des neurones en culture primaire**

### **Protocole d'immunocytofluorescence**

Les neurones sontensemencés dans des boîtes de culture P35 ou des plaques 24 puits sur des lamelles en verre, préalablement recouvertes de poly-D-lysine. Les cellules sont rincées avec du PBS 1X préalablement chauffé à 37°C puis fixées avec 3,7 % de Formaldéhyde diluée dans du PBS 1X et incubées à 37°C pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X et perméabilisées avec une solution de PBS 1X, 0,3 % Triton X-100 pendant 20 minutes à température ambiante.

*Pour visualiser le facteur de transcription NRF2, il est nécessaire de réaliser une étape de perméabilisation supplémentaire au méthanol (-20°C) pendant dix minutes.*

Ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X et saturées pendant 2h à



température ambiante avec une solution de PBS 1X, 10 % sérum de chèvre, 5 % BSA et 0,5 % Tween-20. Puis, les cellules sont incubées pendant une heure à 37°C avec les anticorps primaires dilués dans du PBS 1X, 10 % sérum de chèvre, 5 % BSA et 0,5 % Tween-20. Après trois lavages pendant 5 minutes dans du PBS 1X, 10 % sérum de chèvre, 5 % BSA et 0,5 % Tween-20, les cellules sont incubées pendant 40 minutes à température ambiante avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X, 10 % sérum de chèvre, 5 % BSA et 0,5 % Tween-20, à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules sont lavées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X, 10 % sérum de chèvre, 5 % BSA et 0,5 % Tween-20 et rincées une fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X. Pour marquer les noyaux, les cellules sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante avec du Hoechst dilué dans du PBS 1X (0,5 mg/mL) puis les lamelles sont rincées une fois au PBS 1X et plongée très rapidement dans de l'eau stérile avant d'être montées sur lame avec du Mowiol.

Les observations sont réalisées avec un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 80i) ou confocal (Zeiss 710 Big) et les images sont acquises avec NIS-Element (Nikon Digital Sight DSU2 camera) ou le logiciel ZEN 2011 puis traitées avec le logiciel Image J.

### **Les anticorps primaires et secondaires utilisés**

**Anticorps primaires** : anti-NRF2 (Santa Cruz Biotechnology 1/50<sup>ème</sup>), anti-OXPHOS (Mitosciences 1/50<sup>ème</sup>), anti-MAP2 (Sigma 1/1000<sup>ème</sup>) et anti- $\beta$ -3-tubuline (Sigma 1/1000<sup>ème</sup>).

**Anticorps secondaires** : anti-souris et anti-lapin Alexa 594 et/ou 488 (Molecular Probes, 1/800<sup>ème</sup>).

### **Détermination du nombre de nucléoïdes par immunocytofluorescence**

Le protocole reste le même que celui décrit ci-dessus. Cependant, la saturation et l'incubation des anticorps primaires et secondaires se font dans un tampon différent : de la BSA 10 % finale diluée dans du PBS 1X (le Tween 20 et le sérum de chèvre sont retirés). L'anticorps primaire utilisé est directement adressé aux paires de bases de l'ADN et donc permet de visualiser le noyau et les nucléoïdes dans les mitochondries (anti-ADN, Progen, 1/50<sup>ème</sup>). Cet anticorps est de type IgM, d'origine de souris. L'anticorps secondaire choisi est donc de type IgM couplé à de l'alexa 488, d'origine de chèvre (Molecular Probes, 1/1000<sup>ème</sup>).

La quantification de l'ADN mitochondrial est réalisée à l'aide du logiciel Volocity-3D Image Analysis. Après avoir pris les images au confocal (Zeiss 710 Big), le seuil de détection de l'intensité de fluorescence est déterminé et les noyaux sont exclus de l'analyse. L'intensité de fluorescence cytoplasmique, correspondante aux nucléoïdes, est alors mesurée. Seuls les éléments intégrés aux mitochondries sont pris en compte (comptage des nucléoïdes (vert) dans les mitochondries (rouge)).

## VIII. Techniques relatives à la biochimie des protéines

### VIII. 1. Extraction de protéines (cellules HeLa, neurones, fibroblastes humains et organes de souris)

#### Extraction protéique à partir de cellules HeLa

Trois jours après transfection par siOPA1 ou siContrôle, les cellules sont grattées, lavées dans du PBS 1X et lysées dans un tampon RIPA (Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton 0,1 %, SDS 0,1 %, Dioxycholate 1 %, NP40 1 %, inhibiteurs de protéases Cocktail Tablets Roche® 1X) pendant 30 minutes à 4°C en agitant par vortex toutes les 5 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées selon la technique de Bradford. Les extraits sont repris avec le tampon de charge LSB (Laemmi Sample Buffer) 1X final et conservés à -80°C.

#### Extraction protéique à partir de neurones

Six jours après transfection des neurones par siOPA1 ou siContrôle, les cellules sont grattées et lavées dans du PBS 1X puis reprises avec le tampon de charge LSB (Laemmi Sample Buffer) 2X final. La lyse cellulaire est effectuée par 10 minutes de sonication à bain (1 minute ON, 1 minute OFF), puis les protéines sont conservées à -80°C.

#### Extraction protéique à partir de fibroblastes humains

Les cellules sont grattées, lavées dans du PBS 1X et lysées dans un tampon RIPA (Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton 0,1 %, SDS 0,1 %, Dioxycholate 1 %, NP40 1 %, inhibiteurs de protéases Cocktail Tablets Roche® 1X) pendant 30 minutes à 4°C en agitant par vortex toutes les 5 minutes. Les échantillons sont ensuite soniqués pendant 10 minutes (1 minute ON, 1 minute OFF) puis centrifugés à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées selon la technique de Bradford. Les extraits sont repris avec le tampon de charge LSB (Laemmi Sample Buffer) 1X final et conservés à -80°C.

#### Extraction protéique à partir de cortex de souris

Un morceau de cortex (environ 1/20<sup>ème</sup> du cortex) est repris avec 1 mL de tampon RIPA (Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton 0,1 %, SDS 0,1 %, Dioxycholate 1 %, NP40 1 %, inhibiteurs de protéases Cocktail Tablets Roche® 1X) pendant 30 minutes à 4°C en agitant par vortex toutes les 5 minutes. Les échantillons sont ensuite soniqués pendant 10 minutes (1 minute ON, 1 minute OFF) puis centrifugés à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées selon la technique de Bradford. Les extraits sont repris avec le tampon de charge LSB (Laemmi Sample Buffer) 1X final et conservés à -80°C.

Dioxycholate 1 %, NP40 1 %, inhibiteurs de protéases Cocktail Tablets Roche® 2X). Le tissu est broyé dans un premier temps par 10 coups de potter (tige loose) puis le contenu de l'échantillon est passé au vortex toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Après sonication (à la tige : Amplitude 40%, Pulse 6 sec ON et 6 sec OFF, Temps 1 minute), l'échantillon est centrifugé à 14 000 rpm à 4°C, pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré puis les protéines sont dosées selon le protocole microplaque ci-dessous.

### **Extraction protéique à partir de rétine de souris**

Les rétines (pour une souris) sont reprises avec 100 µL de RIPA (Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton 0,1 %, SDS 0,1 %, Dioxycholate 1 %, NP40 1 %, inhibiteurs de protéases Cocktail Tablets Roche® 2X) puis l'échantillon est passé au vortex toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Après sonication (à la tige : Amplitude 40%, Pulse 6 sec ON et 6 sec OFF, Temps 1 minute), l'échantillon est centrifugé à 14 000 rpm à 4°C, pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré puis les protéines sont dosées selon la technique de Bradford décrite ci-dessous.

### **Dosages protéiques**

- Dosage de Bradford

Le dosage est réalisé dans des cuves contenant 10 µL d'échantillon dilué au 1/10<sup>ème</sup> (en triplicate) et 1 mL de la solution Bradford (Biorad) dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans de l'eau stérile. La Do est lue à 595 nm 10 minutes après le début de la réaction. Une gamme d'IgG (Biorad) est réalisée en parallèle avec 0, 5, 10, 15, 20 et 25 µg de la protéine.

- Dosage en microplaque

2 µL d'échantillon sont déposés en quadruplicat dans une plaque 96 puits. Une gamme d'IgG est réalisée avec 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 µg de la protéine. Les volumes des échantillons et de la gamme sont ajustés à 12 µL final avec de l'eau distillée. Le dosage est réalisé à l'aide du Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque (Perkin Elmer) à 750 nm.

## **VIII. 2. Immunoblot**

Les immunoblots ont été réalisés à partir de protéines issues de cellules HeLa et de neurones transfectés avec siContrôle ou siOPA1, et de fibroblastes humains.

## Immunoblot

Après extraction et dosage des protéines, les échantillons repris dans du LSB1X final sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes et les protéines (50 à 100 µg) sont séparées par SDS-PAGE (migration pendant la nuit à 45V). Après un transfert semi-sec ou liquide sur membrane de nitrocellulose en présence de tampon de transfert (TGS 1X, éthanol 20 %), la membrane est colorée au rouge ponceau puis lavée trois fois pendant 10 minutes avec du TBST 0,2 %. La membrane est ensuite saturée une heure dans une solution de TBST/lait 5 % puis incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBST/lait à 4°C sur la nuit. Après trois lavages de 10 minutes au TBST 0,2 %, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBST/lait pendant 1 heure à température ambiante. Trois derniers lavages au TBST 0,2 % sont réalisés et les protéines sont révélées par chimioluminescence avec le kit ECL (PerkinElmer®) et des films adaptés.

### Les anticorps primaires et secondaires utilisés

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Anticorps	Dilution	Fournisseur
<b>OPA1</b>	1/300	BD-Biosciences	<b>ATP5C1</b>	1/500	Abgent
<b>Actine</b>	1/25000	Chemicon	<b>Aconitase</b>	1/500	Abcam
<b>HSP60</b>	1/8000	Sigma	<b>SOD1</b>	1/2000	Epitomics
<b>OXPHOS</b>	1/200	Mitosciences	<b>SOD2</b>	1/2000	Epitomics
<b>NDUFB4</b>	1/500	Mitosciences	<b>Catalase</b>	1/3000	Abcam
<b>NDUFA9</b>	1/100	Mitosciences	<b>Citrate synthase</b>	1/3000	Abcam
<b>SDHA</b>	1/1000	Abcam	<b>NQO1</b>	1/3000	Abcam
<b>Core 1</b>	1/500	Invitrogen	<b>GSTP1</b>	1/8000	Oxford biochem. Research
<b>COX IV</b>	1/250	Cell signaling technology	<b>FHC</b>	1/500	Abcam
<b>ATP5H</b>	1/5000	Abcam	<b>FLC</b>	1/4000	Abcam
<b>Anti-Mouse HRP</b>	1/10000	Abcam	<b>Anti-Rabbit HRP</b>	1/10000	Abcam

## IX. Techniques utilisées pour les expériences de protéomique

### IX. 1. Préparation de mitochondries issues de neurones

Les mitochondries ont été isolées à partir de neurones en culture primaire. Quatre millions de cellules ont étéensemencées par boîte de 10cm de diamètre (P100) préalablement recouverte de poly-D-lysine au 5X.

Les neurones sont grattés dans le milieu de culture 9 jours (DIV9) après ensemencement et centrifugés à 600 g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont rincés au PBS1X et centrifugés à nouveau à 600 g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots de cellules sont ensuite repris dans du Tampon MB (mannitol 210 mM, sucrose 70 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, inhibiteurs de protéases 1X (Roche)) et fractionnés au potter (130 dounces). La suspension est centrifugée à 800 g pendant 10 minutes à 4°C pour faire sédimenter les cellules non lysées et les noyaux. Le surnageant est conservé à 4°C et le culot a été repris dans du Tampon MB et fractionné une nouvelle fois au potter (50 dounces). Après centrifugation pendant 10 minutes à 800 g à 4°C, le surnageant est récupéré et mélangé avec le surnageant précédant pour être centrifugé à 10 000 g, 15 min, à 4°C afin de séparer le culot de mitochondries du cytosol et des membranes dites légères. Le culot de mitochondrie obtenu est lavé avec du tampon MB et les protéines mitochondriales sont dosées par la méthode de Bradford (Biorad) après solubilisation par ajout de Triton X-100 0,2 % final.

## IX. 2. Co-immunoprécipitation sur mitochondries isolées

### **Cross-link des protéines mitochondriales**

Après préparation des mitochondries à partir de neurones en culture primaire, le culot est repris à une concentration de 6 mg/mL dans du Tampon MB contenant un agent pontant réversible, le DithiobisSuccinimidylPropionate (DSP, 1 mM final, Molecular Probes) pendant 2 heures à 4°C. La réaction a été stoppée par ajout de 125 mM final de glycine pH 7,5. L'échantillon est centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes, à 4°C pour obtenir un culot de mitochondries qui peut être lysé de suite ou congelé à -80°C.

### **Lyse des mitochondries**

Le culot de mitochondries une fois cross-linké est repris avec 800 µL de Tampon d'interaction 1 % Triton X-100 (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, 1 % Triton X-100, inhibiteurs de protéases 1X (Roche)) et incubé 15 minutes dans la glace en agitant par vortex toutes les 5 minutes. Les mitochondries sont lysées par sonication (cycle on/off de 6 secondes, amplitude 40, pendant 1 minute ; Ultrasonic Processor 130 Watts) puis incubées une nouvelle fois sur glace pendant 15 minutes. L'échantillon est centrifugé à 25000 g, 15 minutes à 4°C puis les protéines sont dosées dans la fraction soluble par la méthode de Bradford (Biorad). Un aliquot de protéines mitochondriales est mis de côté et a servi d'« input » lors du dépôt dans le gel SDS-PAGE.

### **Cross-link des billes magnétiques couplées à la protéine G et de l'anticorps anti-OPA1**

Pour environ 3 mg de protéines mitochondriales, 250  $\mu$ L de billes (Invitrogen) couplées à la protéine G sont lavées 3 fois avec une solution d'HEPES pH 7,5 (20 mM final), à l'aide du dispositif aimanté (DynaMag-2, Invitrogen).

Pour l'approche de protéomique, les billes sont ensuite incubées dans 20mM d'HEPES pH 7,6 pendant 30 minutes à température ambiante (sur roue) avec l'agent pontant irréversible Bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS3, 5 mM final, Sigma) et 20  $\mu$ g d'anticorps anti-OPA1 (BD Biosciences) pour la condition IP+ ou sans anticorps pour la condition IP-. Pour les étapes de validation de candidats par immunoprécipitation (IP), une nouvelle condition contrôle a été étudiée : des billes ont été incubées avec un mélange d'anticorps issu de sérum de souris (Sigma).

L'arrêt du cross-link est réalisé avec une solution de Tris HCL pH 7,5, 1 M (50 mM final) pendant 15 minutes, dans la glace. Puis les billes sont lavées 3 fois avec ce même tampon.

### **Co-immunoprécipitation**

La même quantité de protéines est incubée avec les billes +/- anticorps anti-OPA1 dans une solution sans Triton X-100 (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, inhibiteurs de protéases 1X (Roche)) jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de Triton X-100 égale à 0,25 %. L'incubation est réalisée sur la nuit à 4°C (sur roue).

Le surnageant est récupéré et constitue la fraction « non retenue ». Les billes sont lavées trois fois dans un Tampon d'interaction 0,1 % Triton X-100 (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, 0,1 % Triton X-100, inhibiteurs de protéases 1X (Roche)) puis reprises par un volume de tampon LSB 2X (50 à 60  $\mu$ L). Les billes sont chauffées à 95°C pendant 30 minutes pour dénaturer l'interaction antigène-anticorps et rompre les pontages effectués par le DSP. Les surnageants des conditions IP+ et IP- contenant les protéines dénaturées sont récupérés et déposés sur un gel SDS-PAGE. Les protéines, dont OPA1, sont révélées par immunoblot, ou le gel est entièrement coloré à l'argent.

## **IX. 3. Coloration d'un gel SDS-PAGE à l'argent**

Les protéines, destinées à être analysé au spectromètre de masse à la plateforme de protéomique à l'Hôpital Necker (Paris), ont été déposées sur un gel SDS-PAGE. Après migration des échantillons au cours de la nuit, le gel a été récupéré et coloré à l'argent à l'aide d'un kit Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fournisseur.

## Coloration

Dans un premier temps, le gel est rincé deux fois pendant 5 minutes dans de l'eau ultrapure. Ensuite, le gel est incubé deux fois 15 minutes dans la solution de fixation (30 % éthanol, 10 % acide acétique), changée entre les deux lavages. Le gel est lavé deux fois 5 minutes dans une solution d'éthanol à 10 %, puis rincé une nouvelle fois dans deux bains de 5 minutes avec de l'eau ultrapure. Puis le gel est incubé exactement une minute dans solution Silver Stain Sensitizer. Le gel est rincé rapidement deux fois avec de l'eau puis incubé 5 minutes dans la solution Silver Stain Enhancer. Le gel est rincé rapidement deux fois 20 secondes avec de l'eau et incubé immédiatement après avec la solution Developer. Le temps d'incubation ici dépend de l'apparition des bandes, et n'excède pas 2 à 3 minutes en général. Une fois le profil de bandes attendu, le gel est incubé 10 minutes avec une solution d'acide acétique à 5 %. Dès lors, le gel peut être excisé et conservé à 4°C dans de l'acide acétique à 3 % final.

## IX. 4. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

### Le principe général

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêts contenues dans un échantillon. Le principe de cette technique repose sur la possibilité pour un flux d'ions en phase gazeuse d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Un spectromètre de masse comporte toujours : 1) une source d'ionisation (passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules), 2) un analyseur (séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ )), 3) un détecteur (il permet la détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés) et 4) un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres.

Certaines protéines ont des poids moléculaires élevés, ce qui peut empêcher une lecture correcte au spectromètre de masse. Ainsi, les échantillons sont préalablement digérés par la trypsine qui clive les protéines au niveau d'acides aminés basiques (lysine ou arginine), pour donner des peptides de plus petites tailles.

### La technique MALDI-TOF

Le MALDI, avec l'ElectroSpray Ionization (ESI), est une méthode de ionisation douce de

l'échantillon. La technique MALDI consiste à mélanger en excès une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec l'échantillon à analyser. La matrice et l'échantillon co-cristallisent sous l'effet du séchage. La plaque est alors irradiée brièvement par un faisceau laser dirigé sur un petit point de la surface du cristal (0,05 à 0,2 mm de diamètre). Pour obtenir un spectre correct, des centaines de tirs laser sont impulsés sur la cible pour maximiser le processus d'ionisation.

La matrice est essentielle au succès de l'ionisation de l'échantillon. En effet, l'absorption d'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne la désorption (passage en phase gazeuse) des ions du mélange matrice-échantillon. Lors du passage en phase gazeuse, des ions sont transférés des molécules de la matrice à l'échantillon, pour former des ions mono ou multichargés. Les ions produits par la technique MALDI sont majoritairement monochargés. Ainsi, les différentes protéines se chargent positivement ou négativement en fonction de leurs structures peptidiques.

La méthode de ionisation MALDI peut être associée à la technique TOF (Time Of Flight) ou « temps de vol ». Ce mode d'analyse permet d'obtenir une haute résolution pour des molécules de poids moléculaires élevés (Wiley and McLaren, 1955). Dans la technique MALDI-TOF, les ions produits par le mélange matrice-échantillon sont introduits simultanément dans un tube de vol et retenus dans une région libre avant d'être accélérés par une impulsion électrique induisant une différence de potentiel (utilisée pour extraire les fragments positifs ou les fragments négatifs). Les protéines ionisées passent ensuite dans le tube de vol maintenu sous vide et sont séparés en fonction de leur vitesse et donc de leur masse, avant d'atteindre le détecteur. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions de petites masses moléculaires. Les signaux enregistrés par le détecteur sont traités informatiquement. La mesure électrodynamique des ratios  $m/z$  permet de générer un spectre.

L'ensemble des spectres obtenus est analysé *in silico* à l'aide du logiciel Mascot. Ce dernier reconstitue les peptides détectés en fonction de leur  $m/z$  en se basant sur une banque de donnée théorique. De plus, Mascot permet de renseigner le nombre de peptides utilisés pour caractériser chaque protéine de l'échantillon et le score obtenu. Plus le nombre de peptides est important, plus la probabilité d'avoir identifié la bonne protéine est élevée. De plus, le score permet de déterminer le niveau de confiance d'un spectre MS/MS vis-à-vis d'une séquence d'acides aminés présente dans la banque de données.



# Annexes

---

# ANNEXES

---

## I. FUNDC2, une nouvelle protéine surexprimée dans des cellules invalidées pour OPA1

### I. 1. Contexte et objectifs

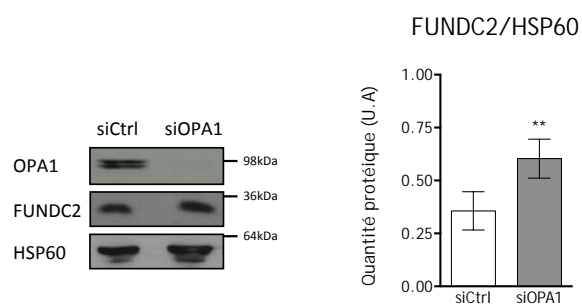
Suite à une étude de protéomique différentielle quantitative réalisée en 2006-2007, l'équipe a mis en évidence des variations d'expression de plusieurs protéines, principalement mitochondriales, consécutives à la perte d'OPA1 dans des cellules HeLa. L'une d'entre elles était la protéine FUNDC2 (FUN14 Domain Containing 2). Pour valider les résultats obtenus en protéomique, nous avons réalisé des immunoblots anti-FUNDC2 et constaté que l'expression de cette protéine est augmentée d'environ 40 % dans des cellules HeLa invalidées pour OPA1 par interférence ARN (Figure 1).

Le gène, codant cette protéine de 20676 Da (189 acides aminés), est localisé sur le chromosome X à la position q28 et sa fonction reste à ce jour inconnue. Ce gène a été évoqué dans deux publications ; sa délétion n'a pas été corrélée avec la pathogenèse des patients atteints d'hémophilie A (Campbell et al. 2007) ou de myopie (Radhakrishna U et al. 2011). Des recherches réalisées *in silico* prédisent une localisation mitochondriale de FUNDC2 et une séquence MIS (Mitochondrial Import Sequence) serait localisée dans les 26 premiers acides aminés de la protéine.

Les problématiques que nous nous sommes posées : comment la perte d'OPA1, une protéine de fusion des membranes internes mitochondriales, induit l'augmentation de la quantité protéique de FUNDC2 ? Existe-t-il un lien entre la dynamique mitochondriale et l'expression intracellulaire de FUNDC2 ?

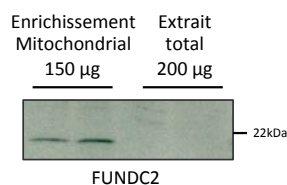
Une autre protéine de cette famille, FUNDC1, est impliquée dans les processus de mitophagie (Liu et al. 2011). En effet, FUNDC1, localisé au niveau de la membrane externe des mitochondries, sert de récepteur à la protéine LC3 et permet ainsi le recrutement de phagosomes pour induire l'autophagie des mitochondries. Les protéines FUNDC1 et FUNDC2 présentent une homologie de séquence de 82 %. Ces deux protéines ont-elles la même fonction dans le processus de mitophagie ? FUNDC2 est-elle également ancrée dans la membrane externe des mitochondries ?

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de la localisation intracellulaire de FUNDC2 endogène et de son expression subcellulaire. Puis, nous nous sommes



**Figure 1 – Expression de FUNDC2 dans des cellules HeLa déplétées pour OPA1**

La quantité de FUNDC2 a été déterminée par immunoblot (n=3) à partir d'enrichissements mitochondriaux issus de cellules HeLa invalidées (siOPA1) ou non (siCtrl) pour OPA1. Le niveau d'expression a été quantifié sur la protéine mitochondriale HSP60. T-test de Student apparié,  $p < 0,01^{**}$ . U.A : Unité Arbitraire.



**Figure 2 – Immunoblot anti-FUNDC2**

La protéine est détectée dans les enrichissements mitochondriaux et pas dans l'extrait total (cellules HeLa).

intéressés aux effets d'une perte de fonction ou d'une surexpression de FUNDC2 sur le réseau mitochondrial, consécutifs à la transfection d'ARN interférant ou d'un vecteur exprimant FUNDC2 étiqueté EGFP.

## I. 2. Modèle expérimental et méthodologie

### I. 2. 1. Perte de fonction de FUNDC2 par une stratégie interférence ARN

Les cellules HeLa ont été transfectées avec un mélange de siRNAs dirigées contre l'ARN messager de FUNDC2 (Dharmacon Research). Pour visualiser l'effet de la perte de FUNDC2 sur la morphologie des mitochondries, les cellules HeLa transfectées ont été incubées avec le colorant intra-vital MitoTracker pendant 40 minutes à 37°C (Invitrogen). Ce composé diffuse dans la cellule et s'accumule dans les mitochondries fonctionnelles ayant un potentiel membranaire élevé.

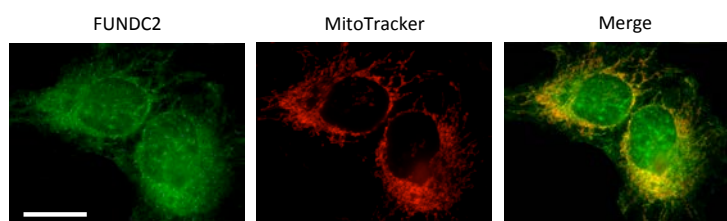
### I. 2. 2. Surexpression de FUNDC2 par une stratégie de clonage de l'ADNc de FUNDC2 dans le vecteur pEGFP N1 (réalisé par Margaux Dastor)

L'analyse de la séquence de la protéine FUNDC2 *in silico* indique la présence d'un signal d'adressage à la mitochondrie et d'un site de clivage au niveau des 26 premiers acides aminés, en N-terminal (Target scan <http://www.cbs.dtu.dk> et mito prot <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/>). Ainsi, afin de ne pas interférer avec le signal d'adressage, nous avons choisi d'étiqueter FUNDC2 dans sa partie C-terminale. Pour suivre sa localisation intracellulaire, nous avons produit une protéine de fusion traductionnelle en amont de la protéine EGFP, à l'aide du vecteur pEGFP N1. Nous avons opté pour un clonage par PCR avec des amorces à queues flottantes présentant les sites de restrictions de BamH1 et Pst1. Ces enzymes ne coupent pas l'ORF de FUNDC2 et sont présentes dans le site multiple de clonage du vecteur pEGFP N1 (Oligo forward : 5' CCC CTG CAG GTG GGA ATG GAA ACA 3' ; Oligo reverse : 5' TT GGC ATG GCA TCC GCG GAT CCA G 3').

## I. 3. Résultats

### I. 3. 1. Localisation intracellulaire de la protéine FUNDC2 et effet de la perte de la protéine sur le réseau mitochondrial

Aucune étude à ce jour ne montrait la localisation de FUNDC2, seules des analyses prédictives réalisées *in silico* la localisaient dans la mitochondrie. Nous avons donc réalisé des

**Figure 3 – Localisation intracellulaire de FUNDC2 endogène**

Immuno-marquages anti-FUNDC2 (anticorps polyclonal) et coloration intra-vitale au Mitotracker (n=2). Le « merge » représente la superposition des deux micrographes (FUNDC2 et Mitotracker).  
*Echelle : 5 $\mu$ m.*

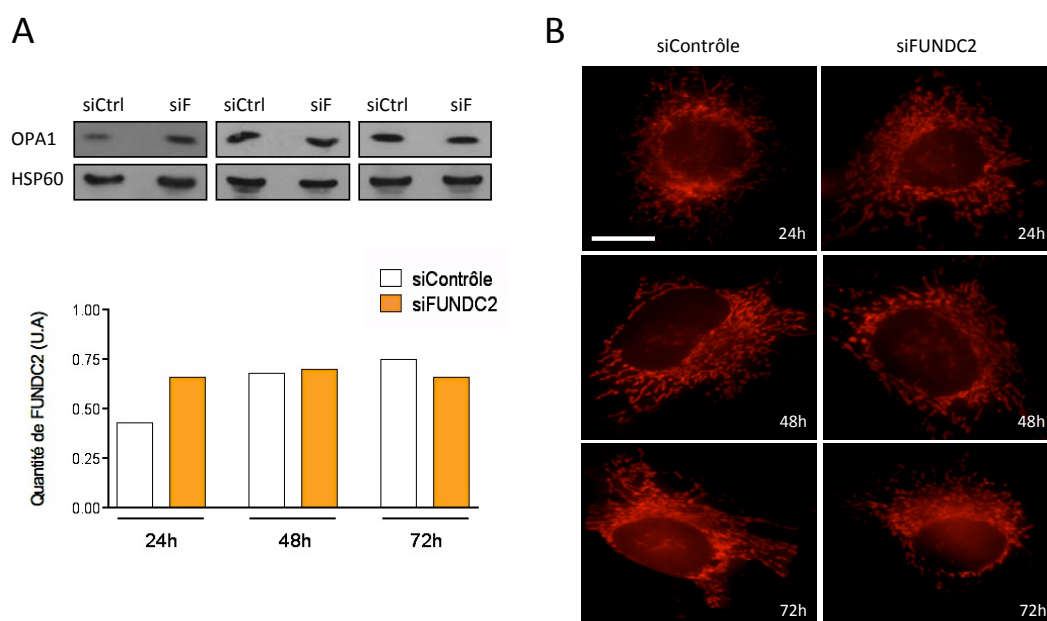
immunoblots dirigés contre FUNDC2 (anticorps polyclonal commercial, Abcam) à partir d'enrichissements mitochondriaux ou d'extraits totaux issus de cellules HeLa. La protéine FUNDC2 n'est pas détectable dans les extraits totaux, alors qu'elle est retrouvée dans la fraction mitochondriale (Figure 2). FUNDC2 aurait donc une localisation mitochondriale et serait en faible abondance dans la cellule. Après avoir réalisé des immunocytofluorescences dirigées contre la protéine FUNDC2 dans des cellules HeLa, nous avons pu montrer une localisation intracellulaire principalement mitochondriale. En effet, le marquage de cette protéine présente une colocalisation partielle avec le réseau mitochondrial, révélé par le colorant intravital MitoTracker (Invitrogen) (Figure 3).

Afin de préciser la fonction de FUNDC2, nous avons d'abord étudié les conséquences de son extinction après transfection par un ARN interférant dans des cellules HeLa. La morphologie des mitochondries observée 24h, 48h ou 72h après transfection indique qu'il n'y a pas de différence entre le groupe contrôle ou « invalidé » pour FUNDC2 (Figure 4). Or, la quantité protéique de FUNDC2, dans des enrichissements mitochondriaux, indique qu'il n'y a pas de diminution d'expression au cours de la culture après transfection avec siFUNDC2. Le mélange de siRNAs ne semble pas être efficace pour diminuer l'expression de la protéine. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'implication de la protéine dans la morphologie du réseau mitochondrial. Les outils qui existent actuellement ne nous permettent pas de poursuivre les investigations de la perte de fonction de FUNDC2.

Nous avons donc opté pour une stratégie alternative consistant à étudier les conséquences de la surexpression de FUNDC2 par transfection de cellules HeLa avec des vecteurs exprimant la protéine de fusion FUNDC2-EGFP.

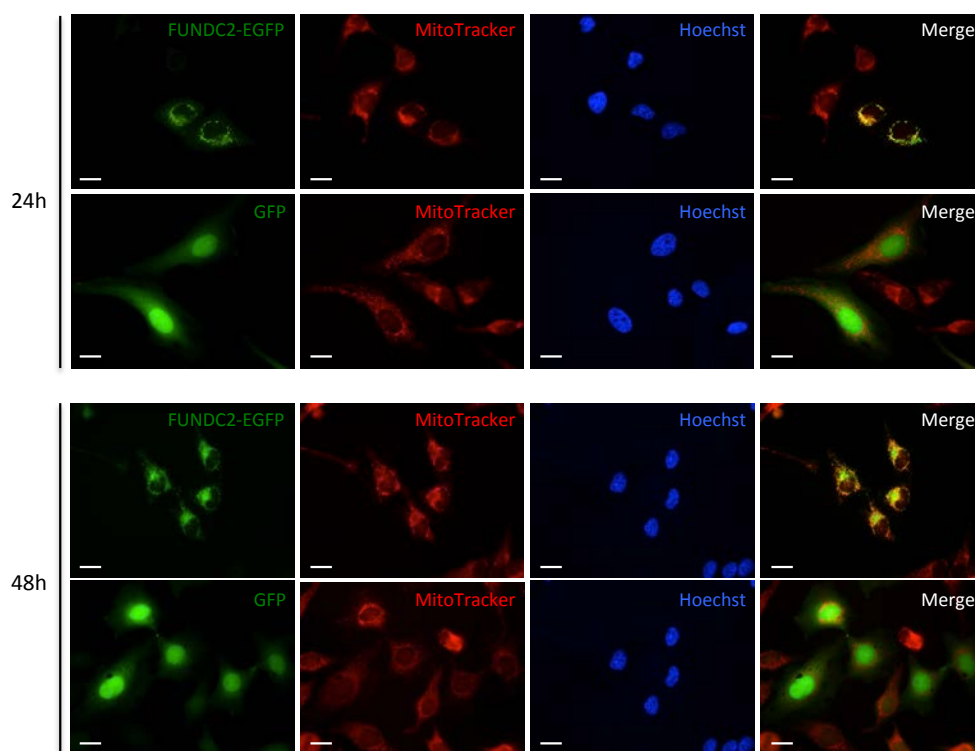
### I. 3. 2. Localisation de FUNDC2 et analyse du réseau mitochondrial après surexpression (réalisé par Margaux Dastor et Valérie Mils)

Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur exprimant la protéine FUNDC2 fusionnée avec EGFP en C terminal. 24h et 48h après transfection, les cellules ont été incubées avec le colorant intra-vital MitoTracker (rouge). Dès 24h de surexpression, l'observation des cellules par microscopie à fluorescence montre une localisation de FUNDC2 préférentiellement au niveau du réseau mitochondrial (Figure 5). Le marquage de FUNDC2 diminue en intensité à 48h mais persiste au niveau de la mitochondrie. Il faut toutefois noter une fluorescence cytoplasmique de FUNDC2 non négligeable.



**Figure 4 – Tests d'efficacité des siRNA dirigés contre l'ARNm de FUNDC2**

(A) La protéine FUNDC2 a été quantifiée dans des enrichissements mitochondriaux issus de cellules HeLa transfectées par siContrôle (siCtrl) ou siFUND2 (siF) (n=1). (B) En parallèle, le réseau mitochondrial a été analysé (MitoTracker). Echelle : 5μm.



**Figure 5 – Analyse de la localisation intracellulaire de FUNDC2 étiquetée GFP, dans des cellules HeLa transfectées par le vecteur pEGFP N1-FUNDC2**

Les cellules HeLa, transfectées avec pmaxGFP (contrôles) ou pEGFP N1-FUNDC2, ont été incubées avec le colorant intra-vital MitoTracker 24h et 48h après transfection. Echelle : 10µm.



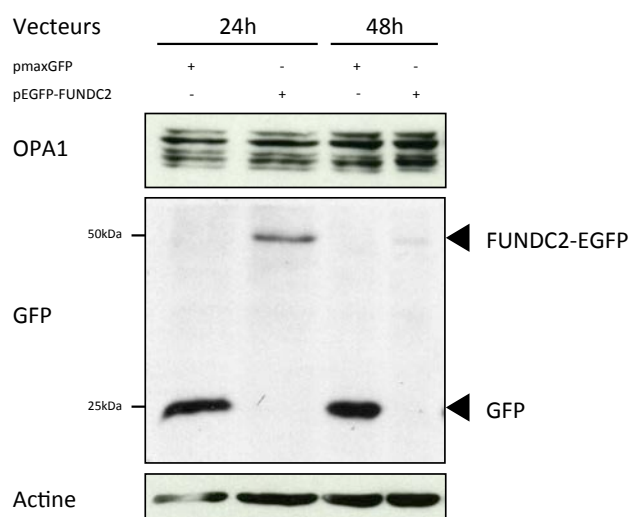
La morphologie du réseau reste de type filamenteux, comme dans les cellules contrôles. Néanmoins, à 24h de transfection, les mitochondries semblent péri-nucléaires alors qu'à 48h cette distribution semble perdue (Figure 5). Une analyse quantitative de la localisation de FUNDC2 intracellulaire est en cours ainsi que le pourcentage de co-localisation avec un marquage mitochondrial (TOM20).

L'expression de la protéine de fusion FUNDC2-EGFP a été analysée par immunoblot (anticorps anti-GFP) à partir de lysats de cellules transfectées avec pmaxGFP (contrôle) ou le vecteur pEGFP N1-FUNDC2. La protéine FUNDC2 est exprimée dès 24h après transfection (Figure 6). Après 48h, la forme exogène est quasiment « perdue ». Cette diminution d'expression de FUNDC2-EGFP peut être corrélée avec une distribution du réseau mitochondrial « normal », 48h après transfection.

## I. 4. Conclusion et Perspectives

Les résultats obtenus en microscopie à fluorescence montrent une colocalisation partielle de la protéine FUNDC2 endogène avec le réseau mitochondrial, visualisé à l'aide du MitoTracker. Ces données corréleraient avec la fluorescence observée au niveau des mitochondries après transfection des cellules HeLa avec le vecteur pEGFP N1-FUNDC2. Cependant une faible proportion de FUNDC2 ne colocalise pas avec le réseau de mitochondries mais présente un marquage cytoplasmique. Des questions se posent alors : i) existe-il deux formes de FUNDC2 présentes respectivement au niveau mitochondrial et cytoplasmique ? ou ii) une seule forme de FUNDC2 fait-elle la navette entre les deux compartiments subcellulaires ? Une analyse de la localisation de FUNDC2-EGFP par microscopie confocale permettrait de préciser plus finement la présence de FUNDC2 à la mitochondrie. Toutefois, les résultats d'immunoblots confirment nos observations en microscopie. En effet, des immunoblots réalisées avec l'anticorps polyclonal anti-FUNDC2 ne révèlent pas la protéine FUNDC2 endogène dans des lysats cellulaires totaux mais seulement à partir d'enrichissements mitochondriaux. Ces données suggèrent également que FUNDC2 endogène est présente en faible quantité. La reproductibilité de ces résultats doit toutefois être testée. Enfin, pour préciser la localisation de FUNDC2 au sein de la mitochondrie, une analyse biochimique est envisagée par des tests de digestion à la trypsine sur des mitochondries purifiées et sur des mitoplastes obtenus par osmolyse (Olichon et al., 2002). Chaque fraction sera analysée par immunoblot pour déterminer le compartiment mitochondrial dans lequel la protéine FUNDC2 est adressée.

FUNDC2 est-elle, comme FUNDC1, un acteur de la mitophagie ? Cette question se pose notamment par l'augmentation d'expression de FUNDC2 consécutives à l'extinction d'OPA1, obtenue



**Figure 6 – Analyse de l'expression de FUNDC2 étiquetée GFP, dans des cellules HeLa transfectées par le vecteur pEGFP N1-FUNDC2**

Des extraits protéiques, à partir de lysats de cellules HeLa transfectées avec pmaxGFP (contrôles) ou pEGFP N1-FUNDC2, ont été analysés par immunoblot 24h et 48h après transfection, avec des anticorps anti-GFP, OPA1 et actine.

dans des cellules HeLa. La protéine OPA1 étant un acteur de fusion de la membrane interne, la perte de cette dynamine engendre une fragmentation du réseau mitochondrial. Dans ces conditions, les mitochondries n'échangent plus leurs matériels, l'hétéroplasmie augmente et certaines mitochondries accumulent des mutations de leur ADN (Chan DC et al, 2012). Ces mitochondries dysfonctionnelles et potentiellement toxiques sont éliminées par un mécanisme de défense sous forme d'autophagie spécifique, appelé la mitophagie. Une hypothèse est donc que la protéine FUNDC2 serait activée suite à la perte d'OPA1 en réponse à la fragmentation des mitochondries. Reste à prouver que FUNDC2, comme son homologue FUNDC1, joue un rôle dans la mitophagie. Pour le démontrer, nous pourrions analyser le processus de mitophagie en réponse à l'induction de FUNDC2, consécutive à la diminution d'OPA1.

# Article

# Down-regulation of OPA1 unbalances redox state, implications in DOA pathogenesis.

## Summary

Mutations in OPA1 gene induce haploinsufficiency that instigate Dominant Optic Atrophy (DOA), an incurable hereditary retinopathy with syndromic forms in up to 20% of patients.

To identify the consequences of OPA1 loss of function on intracellular redox homeostasis, we simulated OPA1 haploinsufficiency, the major mechanism of DOA pathogenesis, using a RNAi strategy in human cells and in rodent primary cortical neuron cultures. We observed decline in mitochondrial respiratory chain activity that associated with reduced aconitase activity, which relates to increased ROS production. We showed nuclear translocation of the NRF2 transcription factor and up-regulation of its target genes; SOD1, SOD2, GSTP1 and catalase. Upon acute exogenous oxidative stress OPA1-depleted neurons were incapable of initiating antioxidant defences, but rather increased cell death. Furthermore, we observed impairment in redox state in the DOA mouse model B6;C3-*OPA1*<sup>329-355del</sup> cortices, along with decreased aconitase activity with no increase in antioxidant enzymes. Interestingly, low contents of SOD1 and SOD2 were observed in fibroblasts derived from some DOA patients compared to healthy volunteers.

The findings demonstrate that OPA1 down-regulation impairs mitochondrial oxidative metabolism. The impairment induces antioxidant responses that are trounced by supplemental oxidative stress thereby prompting accelerated cell death. Furthermore, low expression of some antioxidant enzymes in several DOA patients supports their role as modifier factors for DOA that can be used prognostically to gauge the severity and evolution of the disease. We also propose the use of antioxidants as potential therapeutics in DOA patients to prevent or delay onset of the symptoms.

## Introduction

Mitochondria are cellular powerhouse *via* oxidative phosphorylation (1) and mitochondrial diseases can be caused by mutations in the genes of mitochondrial or nuclear DNA (2). Although many of them are multisystemic, some are tissue specific such as optic neuropathies that are due to alterations of mitochondrial functions (3), as illustrated by the identification of ND1-6, OPA1, OPA3 and TMEM126A as causative genes for LHON (OMIM#535000), type 1 autosomal dominant optic atrophy (OMIM#165500), autosomal dominant optic atrophy and cataract (OMIM#606580), and recessive optic atrophy 7 (OMIM#612989), respectively that add up numerous syndromic forms of optic atrophy implying mitochondrial proteins (FDRA, HSP7, HMSN).

Dominant Optic Atrophy (DOA), also known as Kjer's disease, is characterized by moderate to severe loss of visual acuity with insidious onset in early childhood and penetrance may be as low as 40% (4-6). Estimated disease prevalence is 1:10,000 in Denmark and 1:50,000 worldwide. This complex pathology remains without effective treatment. The majority of patients (~75%) with DOA harbor mutation in the *OPA1* gene coding for a mitochondrial GTPase (7, 8). 280 different *OPA1* mutations have been reported (<http://mitodyn.org>), the majority of which result in premature termination ensuing haploinsufficiency by the reduction in OPA1 protein levels (4). There is marked inter- and intra-familial variability in the rate of disease progression, but a significant proportion of patients (50-75%) will experience visual worsening in later life (9, 10). Recent studies show a severe multi-systemic disorder associated with some *OPA1* mutations, named 'DOA plus' (DOA+) syndrome (OMIM#125250) (11-14). These patients present additional neurological complications as ataxia, sensorineural deafness, chronic progressive external ophtalmoplegia, sensory-motor neuropathy and myopathy. Of note, a 2- to 3-fold increased risk of developing multi-system neurological disease with missense *OPA1* mutations located within the GTPase domain, suggests deleterious gain-of-function mechanisms. Although these syndromal DOA variants show significant phenotypic variability, a consistent finding is worse visual prognosis among this patient subgroup. These observations are of

major pathophysiological importance, highlighting the widespread deleterious consequences of OPA1 mutations, not only for retinal ganglion cells (RGCs), but particularly for other neuronal populations, skeletal and extra-ocular muscles (13, 15, 16).

The *OPA1* gene encodes a mitochondrial protein localized in the mitochondrial inter-membrane space (IMS) and anchored to mitochondrial inner membrane (17-20). Using common genetically modified cells lines (HeLa, COS, MEF), we and others have shown that OPA1 has various functions (21), including inner membrane fusion, cristae structuration, mtDNA maintenance, mitochondrial energetic modulation and protection from apoptosis (21-24). Patient isolated skin-fibroblasts, muscle, or lymphoblasts have shown impairments in mitochondrial morphology, respiration and energetic, loss of mtDNA integrity, and an increased sensitivity to apoptosis (25, 26). However several contradictory reports for energetic defects in DOA patients exist (21, 27). Mouse DOA or DOA+ models evidenced mitochondrial fragmentation, cristae disorganisation, increased mitophagy, cytochrome c oxidase deficiency (28-30). In *Caenorhabditis Elegans*, mutations of the *OPA1* gene ortholog, *eat-3*, cause mitochondrial fragmentation and inner membrane septa accumulation in matrix, both suggesting defects in fusion, and hypersensitivity to oxidative stress; but no evidence for increased cell death (31). Heterozygous mutations result in a shortened lifespan, increased ROS production, sensitivity to oxidative stress, defects in activity of respiratory chain complexes, aberrant mitochondrial structures as well as heart, skeletal muscle and eye dysfunctions of which the later is partially reversed by antioxidant treatments (32, 33). These two DOA invertebrate models (31-34) emphasize the critical generation of ROS associated to OPA1 dysfunction, as it was proposed for Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) (35) and other neurodegenerative pathologies such as Alzheimer and Parkinson diseases (36). In this context, it is necessary to precise the molecular mechanisms explaining how inactivation of OPA1 function contributes to DOA pathogenesis. Since haploinsufficiency is primarily responsible for DOA and as the effects of OPA1 inactivation are not restricted to RGCs, we addressed the question of the general impact of OPA1 inactivation on oxidative metabolism by down-regulating OPA1 for the first time, in primary neurons

cultures and in HeLa cells by RNA interference supported by in vivo data, we evidenced implication of Reactive Oxygen Species (ROS) as a key determinant of DOA pathogenesis. Indeed, our results show that reduction in OPA1 results in diminished cellular respiration, accompanied by an increase in mitochondrial ROS production which is buffered by the activation of NRF2 pathway and increased levels and activities of two antioxidant enzymes, superoxide dismutases and catalase. However, this situation leads to a pro-oxidative state, since additional acute or chronic exogenous oxidative stress challenged both the antioxidant response and viability of OPA1 depleted neurons. In OPA1<sup>+/-</sup> mice, cortices fall in a prooxidative state at 10 months even if an antioxidant response was activated. Finally, we assessed the antioxidant machinery in fibroblasts from DOA patients and healthy volunteers. We found, even if a great heterogeneity exists both in control and DOA fibroblasts, some patients showed altered expression of antioxidant genes. Thus, these novel findings have shown that mutations or decreased quantity of OPA1 imbalance cellular redox state, weakening cells to exogenous pro-oxidative stresses. This phenomenon is likely a key molecular mechanism underlying DOA pathogenesis.

## Results

### 1. Respiration is impaired in OPA1 down-regulated cells.

OPA1 down-regulation is known to negatively impact respiration in various cells lines (39-41). We evaluated the effect of OPA1 down-regulation on respiration in neurons for the first time, and in HeLa cells as a control, transfected with siRNA directed against OPA1 (siOPA1) or against control RNA (siCtrl). In HeLa cells, OPA1 quantity is reduced by 92.3 % 72 hours after transfection (Supplemental Figure 1A). As previously described, neurons in primary culture treated with siOPA1, show 70.5 % decrease in OPA1 quantity Day 6 post-transfection (42) (Supplemental Figure 1B). Interestingly, citrate synthase, HSP60, VDAC and TOM20 levels were unchanged (Supplemental Figure 1), suggesting that mitochondria quantity was not affected by siOPA1 down-regulation. Reinforcing this



conclusion the activity of citrate synthase did not change in siOPA1 transfected HeLa cells (Supplemental Figure 2B).

The effect of OPA1 reduction on mitochondrial respiration was investigated using Seahorse XF24 analyzer (Seahorse Bioscience). In all conditions, rotenone and antimycin treatment considerably inhibited the Oxygen Consumption Rate (OCR) showing that more than 95% of oxygen consumption was due to mitochondrial respiration (Figure 1A and B). In siCtrl transfected cells, oligomycin inhibited ATP-linked respiration, while addition of the protonophore FCCP that uncouples oxidation and phosphorylation, resulted in maximal OCR. In both siOPA1 transfected neurons (Figure 1A) and HeLa cells (Figure 1B), spontaneous respiration was reduced by 32.4 % and 38.1 % respectively, when compared to siCtrl treated cells. Furthermore, ATP-linked respiration was reduced by 34 % and 40.5 % and the maximal OCR was reduced by 46.1 % and 58.2 %, respectively. Contrary to siCtrl transfected cells, the maximal OCR in siOPA1 treated cells was not significantly different that spontaneous OCR.

Therefore, depletion of OPA1 in both neurons and HeLa cells induced a dramatic decrease in spontaneous, ATP-linked respiration and maximal mitochondrial respiration without affecting the mitochondrial biomass (Supplemental Figure 1). This effect could be explained by a decrease in the levels of mitochondrial respiratory chain (MRC) subunits, as we recently showed in neurons (42). Similar results were obtained in OPA1 silenced HeLa cells for the subunits NDUFB4 (Complex I), SDHB (Complex II), Core2 (Complex III) and COX I (Complex IV), which were decreased by about 44.7 %, 29.2 %, 39.4 % and 46.4 %, respectively (Figure 1C), while others subunit quantities of each complexes such as NDUF9 (Complex I), SDHA (Complex II), Core1 (Complex III) and COX IV (Complex IV) were unchanged, (Figure 1C). Corresponding to our previous findings in neurons (42) three subunits of ATP synthase (alpha and gamma for F1 complex and d for F0 complex) were unaffected by OPA1 silencing in HeLa cells (Figure 1C). Accordingly, total ATP cellular concentration did not vary upon OPA1 down-regulation (Supplemental Figure 2A). Furthermore, no difference in total NADH,

$H^+/NAD^+$  intracellular level was observed between siOPA1 and siCtrl treated HeLa cells (Supplemental Figure 2B). Accordingly, four TCA cycle enzymes showed only a slight decreased activity (succinate dehydrogenase and fumarase) or no change (citrate synthase and malate dehydrogenase) in siOPA1 *versus* siCtrl transfected HeLa cells (Supplemental Figure 2C). Moreover, there was no supplemental shift towards glycolysis induced by the drop of OPA1 in HeLa cells, as measured by lactate levels in culture media (Supplemental Figure 2D). Altogether, these experiments suggest there is no major disruption in the TCA cycle or NADH,  $H^+$  furniture in OPA1 siRNA treated HeLa cells.

## 2. OPA1 down-regulation imbalances redox state.

Impaired MRC functioning, without disruption in the TCA cycle and furniture in NADH,  $H^+$  could lead to a potential imbalance in redox state because of increased electron leaks. To investigate this hypothesis, we first measured total ROS contents with the  $H_2$ -DCFDA probe. As previously described in siOPA1 treated neurons (42) a 23.9 % decrease in ROS levels was observed in OPA1 down-regulated HeLa cells 72 hours after transfection (Figure 2A). However, aconitase activity was reduced both in siOPA1 treated HeLa cells and neurons of 34.2 % and 33.8 % respectively (Figures 2B and 2C). This drop could not be attributed to change in protein quantities since aconitase protein levels were unchanged in both siOPA1 treated cell types (Supplemental Figures 3A and 3B). Aconitase activity was shown to be highly sensitive to oxidation due to damaged FeS core and inhibition of its activity is used as a signature of increased mitochondrial ROS production (43-45). The observed decrease in total ROS together with increased production of mitochondrial ROS suggested an activation of antioxidant responses. To verify this hypothesis, we analysed a redox state marker, the glutathione. In siOPA1 treated HeLa cells (Figure 2D) and neurons (Figure 2E) the ratio between reduced (GSH) to oxidized (GSSG) glutathione increased of 78.1 % and 120.2 %, respectively. Altogether, these results imply that OPA1 down-regulation activates antioxidant responses to buffer increased ROS production.

## 3. NRF2 pathway is activated upon down regulation of OPA1.

Since NRF2 pathway accounts for a great part of oxidative stress responses, we investigated if this transcription factor is responsive to oxidative metabolism imbalance due to reduced OPA1. We first followed the intracellular localisation of NRF2. 72 hours post-transfection, 51.7 % of siOPA1 treated HeLa cells presented NRF2 nuclear localisation whereas only 15.2 % of siCtrl-treated HeLa cells showed NRF2 in the nucleus (Figure 3A). Kinetics of NRF2 relocalisation from 66 hours to 72 hours post-transfection showed a significant NRF2 nuclear relocalisation 67 hours after transfection (Supplemental Figure 4). In neurons, the decreased quantity of OPA1 induced a 1.3 increase of nuclear NRF2 fluorescence compared to siCtrl cells (Figure 3B). Thus, since its nuclear translocation be a part of its activation, we concluded that down-regulation of OPA1 induced NRF2 activation.

We thus explored the targets of NRF2, superoxide dismutases 1 and 2 (SOD1 and SOD2) that catalyse the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide the latter being detoxified in part by catalase, another NRF2 target, into water and O<sub>2</sub>. Quantities of SOD1 and SOD2 proteins in siOPA1 treated HeLa cells were significantly increased (32.9 %) or unchanged when compared to control cells (Figure 4A); accordingly, a 37 % increase of total SOD activity was detected (Figure 4B). In neurons no statistical differences in SOD quantities were detected (Supplemental Figure 5C). Neither the quantity nor the activity of catalase changed in siOPA1 transfected HeLa cells (Supplemental Figures 5A and 5B), while an increase of both catalase quantity (88.2 %) and activity (61.6 %) were revealed in neurons (Figure 4C and 4D). Altogether these results suggest that in OPA1 reduced HeLa cells and neurons a NRF2 detoxifying way of superoxide anion is activated.

No difference between siOPA1 and siCtrl treated HeLa cells or neurons were observed for other NRF2 targets, except for GSTP1 in HeLa cells (Supplemental Figures 5A and 5C).

#### 4. Potent oxidative stress challenges viability of OPA1 down-regulated neurons

Since OPA1 down-regulation leads to increased mitochondrial production of ROS that is overcome by induction of antioxidant response, we addressed the impact of an additional acute or chronic oxidative stress in OPA1 down-regulated cells. Neurons were incubated with rotenone, a

potent inhibitor of respiratory complex I that induces a major oxidative stress (46, 47). A supplemental stress would therefore be deleterious for cell viability. We checked this hypothesis by estimating the viability (Figure 5A) and number of picnotic nuclei (Figure 5B) of siCtrl and siOPA1 transfected neurons treated with acute treatment of rotenone (1 hour, 500 nM). Decreased viability estimated by trypan blue exclusion assay (6.7 %) and increased apoptosis estimated by the number of picnotic nuclei (20.8%) of siOPA1 transfected cells compared to siCtrl transfected cells (13.7 %) were observed, suggesting that antioxidant defences are overwhelmed in OPA1 down-regulated conditions. We checked antioxidant responses by analysing the NRF2 nuclear translocation as well as SOD1, SOD2 and catalase quantities in siCtrl and siOPA1 transfected neurons (Figures 5C and 5D). Upon acute rotenone treatment (1 hour, 500 nM), NRF2 translocation is increased by 1.21 in rotenone treated siCtrl transfected neurons but not in rotenone treated siOPA1 transfected neurons (Figure 5C). Upon rotenone stress, SOD1 quantity was increased in siCtrl-transfected neurons, but not in siOPA1-transfected neurons (Figure 5D). There was no change for SOD2 quantities in either condition (Figure 5D). Contrary to levels in basal conditions, there is no difference in catalase quantities in siOPA1 and siCtrl rotenone treated neurons (Figure 5D). These results suggest that down-regulation of OPA1 results in maximal catalase induction that cannot be further increased upon rotenone-induced oxidative stress. Moreover, we checked viability of neurons upon a chronic oxidative stress (24h and 48h, 50 nM rotenone). The viability is systematically lower in siOPA1 transfected neurons (Supplemental Figure 6).

#### 5. *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice show imbalanced oxidative metabolism.

Cortices from 4 and 10 months old transgenic mice were analysed for ROS and contents in antioxidant defences. First of all, OPA1 contents were checked and found down-regulated in *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice cortices compared to the litter mate mice (Supplemental Figure 7A). We then, measured aconitase activity as a sensor of mitochondrial ROS production. A 56.7 % inhibition was observed in 10 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice compared to litter mate mice, while no significant decrease was evidenced in 4 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (Figure 6A). Furthermore, aconitase activity is

significantly decreased (48.9 %) from 4 to 10 months *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice (Figure 6A). In all cases, aconitase quantities are unchanged (Supplemental Figure 7B). We next analyzed expression of SOD1, SOD2 and catalase on the same mice and found that SOD1 is decreased (37.3 %) in 4 months old transgenic mice compared to litter mate mice (Figure 6B). Moreover, SOD1 and SOD2 are 114.5 % and 47.6 % increased between 4 and 10 months respectively in *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice (Figure 6B), while catalase quantities and activities are stable in all tested conditions (Figure 6B and Supplemental Figure 7C). Altogether, our findings indicate that during the 6 months interval (between 4-10 months old studied subjects) there is an activation in antioxidant defences but not sufficiently to buffer the mitochondrial ROS production potentially leading to oxidative stress that seems well established in these transgenic mice.

#### 6. Cellular antioxidant defences are impaired in certain fibroblasts from DOA patients.

We next addressed the question of antioxidant defences in DOA patients' fibroblasts (Table 1). SOD1, SOD2, catalase, GSTP1 and NQO1 were studied by immunoblot analysis (Figure 7 and Supplemental Figure 8). Fibroblasts from five healthy volunteers (C1-C5) and eight DOA patients (P1-P8) were analysed. Even though heterogeneity exist between healthy volunteers and DOA patients in antioxidant defences, some patients showed altered expression of antioxidant genes (Figure 7 and Supplemental Figure 8). Patients P1, P3, P5 and P7 express significantly low levels of SOD1 and SOD2 proteins. For Catalase, GSTP1 and NQO1, no patient presented a drop of proteins as obtained for SOD1 and SOD2 (Figure 7 and Supplemental Figure 8). It is of particular importance to underline that the rates of expression of antioxidant proteins described above are not correlated with the age or sex of patients (Table 1 and Supplemental Figure 8). These results show actual heterogeneity of SODs content in patient fibroblasts, which could be related to the DOA pathogenesis.

## Discussion

### 1. Imbalanced Mitochondrial respiration

In the present work, we show that down-regulation of OPA1 induces a drastic decline in endogenous mitochondrial respiration in primary cultured neurons and in HeLa cells, wherein the citrate cycle is not globally diminished. Both siOPA1 treated neurons and HeLa cells showed maximal mitochondrial respiration, which does not surpass basal mitochondrial respiration, thus suggesting MRC deregulation due to reduction in different subunits of complex I to IV, according to results already obtained with inhibition of complex I (48) or disorganisation of cristae (49) *via* the Seahorse technology. Defects in mitochondrial respiration have been observed in several OPA1 inactivated cell lines. According to our results, in MEFs, OPA1 depleted cells showed severe reduction of endogenous respiration, without stimulation upon uncoupler addition, and, a diminution of oxygen consumption driven by complexes I, II and IV (41). A study concerning the consequences of OPA1 mutations on energetic metabolism revealed defective oxidative phosphorylation with lowered ATP production in DOA patient muscle samples (26). Studies using fibroblasts from DOA patients that contain various OPA1 mutations support a coupling defect of oxidative phosphorylation with reduction in complex IV and amplification in complex V, together with no change in ATP production (50). The existence and the nature of the energetic defect in DOA patients appear controversial (see Landes et Belenguer for review) since energetic defect is not found in mitochondria of lymphoblastoid lines derived from DOA-1 patients (40), nor in muscle biopsies of patients harboring a deletion of the GTPase domain of OPA1 (15).

Decreased mitochondrial respiration induced by OPA1 down-regulation could originate from direct misregulation of MRC and/or disorganisation of the mitochondrial inner membrane structure (49). Zanna and coll. have indeed shown that OPA1 interacts with respiratory complexes I, II and III (25). Furthermore, we showed that waning levels of OPA1 decreases the quantity of MRC complex subunits. However, except for complex II which activity is decreased of 25%, the complex I, III and IV

activities remain stable (data not shown). Therefore, decreased mitochondrial respiration appears not to be directly linked to an inhibition of the intrinsic respiratory complex activity.

The decreased respiration in siOPA1 treated cells could relate to perturbations of the spatial organisation of the MRC, since loss of OPA1 was previously shown to disrupt the inner mitochondrial membrane structuring (18, 22). Respiratory chain complex organisation into supercomplexes (RCS) is indeed essential for assembly and stability of each complex (51-53) and appeared to be involved in the efficiency of electron transfer (54, 55) (56). Decreased respiration observed upon OPA1 down-regulation could be explained by disruption of RCS generating free and less active forms of respiratory complexes. Accordingly, Cogliati and coll recently demonstrated that the loss of OPA1 in mouse fibroblasts causes defects in RCS formation (57). On the other hand, (58) recently linked mitochondrial respiration and mitochondrial fusion through the fusogenic function of OPA1. However, DOA fibroblasts showing respiratory mitochondrial defects, do not always show mitochondrial morphological alterations suggesting that the pathophysiology of DOA could be related to an energetic defect rather than an impairment of mitochondrial morphology (50).

## 2. OPA1 down-regulation induces a pro-oxidant state

Impairing mitochondrial respiration with a normal furniture of the MRC leads naturally to increased ROS production, as we show in siOPA1 treated neurons and Hela cells. Accordingly, defects in respiratory chain complex activity associated to increased ROS production was observed in OPA1 mutated drosophila (34). We demonstrated that such a situation activates the NRF2 pathway, which is one of the major ways to detoxify cells (59). Down-regulation of OPA1 in HeLa cells and neurons indeed induced re-localisation of the NRF2 transcription factor into the nucleus, where it up-regulates target genes bearing ARE (antioxidant responsive elements) promoter elements, such as SOD and catalase. Additional exogenous oxidative stress induced by rotenone resulted in decreased neuron viability, suggesting that antioxidant defences are overwhelmed. Accordingly, mutations of the *OPA1* gene ortholog in *Caenorhabditis Elegans* and in drosophila cause hypersensitivity to

oxidative stress (31, 32). Furthermore, SOD1, SOD2 and catalase levels were unaltered upon acute oxidative stress in SiOPA1 treated cells as opposed to, siCtrl transfected cells, which induced SOD1 levels. Supporting the *in vitro* data, in 10 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice cortices, aconitase activity is decreased suggesting a burst in mitochondrial ROS production, which is not statistically significant in 4 months *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice cortices. This pro-oxidant state is concomitant with an increase of SOD1 and SOD2 quantities in *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice cortices between 4 and 10 months. Surprisingly SOD1 quantity is decreased in 4 months *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice as previously described for SOD2 in the retina of 9 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice (60). These results emphasize the critical generation of ROS associated to OPA1 dysfunction, as it was proposed for Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) (35) and other neurodegenerative pathologies such as Alzheimer and Parkinson diseases (36)

### 3. Implications in DOA pathogenesis and potential therapeutic approaches.

In this work, we highlight the dysregulation of oxidative metabolism in cells mutated or reduced for OPA1. The different observations allow us to propose a model in which the redox state imbalance could fall into an oxidative stress when some injuries such as UV light, blue light, smoke, aging or diet are present. Photochemical injury in the pigmented retinal epithelium is related to the wavelength of incident light, and the threshold for damage is lowest for blue-light in the visible spectrum (61) and continues to increase for wavelengths below 400nm. Indeed, as demonstrated in aphakic monkeys, the retina is six times more sensitive to 350- and 325-nm wavelengths than to blue light (441 nm). Interestingly, some studies described increased sensitivity of RGCs to blue light (62, 63). In contrast to blue light, ultraviolet light produces irreparable damage to rod and cone photoreceptors (64). Additionally, within the retina, mtDNA lesions reach remarkable levels in all regions of the mitochondrial genome upon exposure to endogenous ROS generated from the mitochondria themselves or from photosensitizers (65) for review see (66).



Mitochondria have long been proposed to play a key role in aging (67). As a consequence of their central role in ATP formation via the MRC, mitochondria are the major source of ROS and are thus highly involved in oxidative stress processes (68). However, mitochondria are also targets of these molecules (68). Under physiological conditions, about 1–3% of molecular oxygen is incompletely reduced during redox reactions in the MRC, and this in turn leads to production of the ROS superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) by-products. In this scenario, complex interactions in antioxidant defence systems repress oxidative stress within mitochondria (69). Cellular systems that protect against oxidants involve antioxidant defence enzymes (superoxide dismutase [SOD], glutathione peroxidase [GPx], and catalase) (69), oxidant scavengers (vitamin E, vitamin C, carotenoids, uric acid, and polyphenols) and mechanisms that repair oxidant-induced damage to lipids, proteins, or DNA. Despite these protective mechanisms, uncontrolled generation of ROS can overwhelm the capacity of antioxidant protection causing mitochondrial dysfunction. *In vivo* studies in transgenic mice showed that the overexpression of catalase targeted to mitochondria reduces age-associated pathologies and the mice have an extension in lifespan (71, 72). According to these observations, our whole work clearly suggests that down-regulation of OPA1 in cellular and animal models induces an imbalance of the redox state, which could lead to premature cellular ageing.

Our goal to precisely analyze and characterize energetic metabolism in different models of DOA is written for a growing axis of investigation common to different neurodegenerative optic atrophies including Leber Syndrome. In this context, numerous studies suggest increasing mitochondrial antioxidant defences to rescue cells (73, 74). Among the possibilities to induce cytoprotection, inducers of ARE are mainly considered. In contrast to direct antioxidants (vitamin C, E and beta-carotene), a number of plant-derived antioxidant compounds, which include resveratrol, isothiocyanate, catechins and curcumin, are indeed weak prooxidants, are indirect (75) (76) (77). Acting as weak prooxidants, they have limited ability to cause oxidative damage, yet they are potent enough to activate the NRF2-mediated adaptive response (76) (78) (79). In this context, low-dose prooxidants such as isothiocyanate and resveratrol may activate the NRF2 antioxidant system

therefore protecting against existing or future high-level stresses (80). Given that our findings that OPA1 down-regulation activates NRF2 pathway, the pro-oxidant compounds are insufficient therapeutic approaches in DOA pathology. Instead, direct testing of antioxidant compounds may be a superior therapeutic approach for DOA. A recent study focused on Idebenone as a potential curative compound for DOA patients (81). Idebenone is a benzoquinone that transfers electrons to complex III bypassing complex I (82, 83) and has antioxidant properties (82). It is of high interest to identify patients able to induce an NRF2 response and if not to characterize the level in the signalling pathway where there is a gap (see results for SOD2 with DOA patient 2 in our results). These future aims will be twofold: first to reveal modifier genes responsible for DOA pathology and, second, to develop directed pharmacological therapeutics or preventative measures for DOA pathogenesis.

## Methods

### 1. Cell culture

HeLa cells, from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/l glucose (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10 % FCS, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml), in an incubator at 37°C and 5 % CO<sub>2</sub>. HeLa cells were electroporated using Cell line kit R (Amaxa, Lonza) with 1,5 µg of control siRNA (D-001210-02, Dharmacon Research) or human OPA1 siRNA (D-005273-03, target sequence AAAGAAGGCUGUACCGUUA, Dharmacon Research) per 10<sup>6</sup> cells.

All animals (n = 45, 350 embryos) in this study were ethically maintained and used as ethical laws of CNRS. Day 17 embryos were removed from pregnant Wistar rats (Janvier) under intraperitoneal pentobarbital (Sigma) anaesthesia. Cortices were dissected, enzymatically dissociated with papain (10 U/ml, Sigma), then exposed for 5 min in a solution that inactivated papain: DNase I (Invitrogen) and B27 (Gibco), diluted in PBS 1X with D-Glucose (33 mM, Sigma). Cells were dissociated by trituration and filtered through a membrane (70 µm, BD Falcon). Cells were then

purified through a BSA solution (8 %, Sigma) diluted in Neurobasal A-25 (Invitrogen). Dishes, with or without glass cover-slips, were coated with poly-D-lysine (0.1 mg/ml, Sigma) 24h prior to culturing. For each experiment, cortices from 8 to 12 embryos per rat are mixed. Experiments were reproduced three to eight times. Cultures were grown in Neurobasal® (Eurobio) supplemented with B27 (Invitrogen), 2 mM glutamine, 0.1 % penicillin and streptomycin (Gibco), 250U/ml amphotericin (Invitrogen) and 1 mM lactic acid (Sigma) at a density of  $6 \cdot 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$ .

Cortical cells ( $5 \cdot 10^6$ ) were electroporated using the Rat Neuron Nucleofector Kit (Amaxa, Lonza) according to the manufacturers' optimized protocol with 3  $\mu\text{g}$  of control luciferase-targeting (D-001210-02, Dharmacon Research) or OPA1-targeting (target sequence GAUUGUGCCUGACUUUAUA, Dharmacon Research) small interfering RNA (Dharmacon).

Fibroblasts obtained by skin biopsy from consenting DOA patients and healthy volunteers were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/l glucose (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10 % FCS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) and maintained for up to 20 passages. Ethical approval: the use of patient fibroblasts for research purpose in neurogenetics was approved by the "Comité de Protection des Personnes Ouest II - Angers" (N° CB 2014/02).

## 2. Animals: *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice

Mice were kept in a 12h light/12h dark cycle with food and water available *ad libitum* in full-barrier facilities free of specific pathogens. Mouse breeding and all experimental procedures were performed according to ethical laws of CNRS. The *OPA1*<sup>enu/+</sup> strain (abbreviated *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice) has been initially described by Alavi and coll. (29). All examined mice were either sacrificed at 4 or 10 months old.

## 3. Measurement of oxygen consumption

Oxygen consumption rates (OCR) were performed using the XF24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA). HeLa cells ( $15 \cdot 10^3$ ) or neurons ( $3 \cdot 10^5$ ) transfected with

control siRNA or siOPA1 were plated on XF24 microplates 3 days or 6 days respectively before OCR measurements. Dual-analyte sensor cartridges were soaked in XF Calibrant Solution (Seahorse Biosciences) in 24 well cell culture microplates overnight at 37°C to hydrate. Approximately one hour prior to experimentation, injection ports on the sensor cartridge were filled with oligomycin (0,6 µM for neurons, 1 µM for HeLa cells), Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) (6 µM for neurons, 1µM for HeLa cells) and rotenone (50 nM for neurons, 1 µM for HeLa cells) with antimycin A (C: 0,182 µM for neurons and 1 µM for HeLa cells). The plate was then loaded into the XF24 instrument for calibration. For oxygen consumption measurement, growth media of neurons or HeLa cells were replaced with incubation media (DMEM supplemented with NaCl (143mM), PhénolRed (3mg/ml), glucose (10mM), glutamine (2mM) and pyruvate (2mM) at pH 7.4, and kept at 37°C), 1h prior experimentation. The XF24 microplate was then loaded into the Seahorse XF24 analyser following the manufacturer's instructions. All experiments were carried out at 37°C.

#### 4. Immunoblot analysis

Transfected HeLa cells or neurons were lysed for 30 min in a buffer containing 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 % Deoxycholate, 1 % NP40 and protease inhibitors (« Complete » protease inhibitor mixture, Roche Applied Science). Cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. The total protein concentration was determined in the supernatant using the Bradford Protein-assay (Bio-Rad).

Human fibroblasts were lysed for 30 min in a buffer containing 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 % Deoxycholate, 1 % NP40 and protease inhibitors (« Complete » protease inhibitor mixture, Roche Applied Science). After sonication (cycles of 6 seconds ON / 6 seconds OFF, amplitude 40%, during 1 minute), cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. The total protein concentration was determined in the supernatant using the Bradford Protein-assay (Bio-Rad).

Frozen cortices of mice were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 % Deoxycholate, 1 % NP40 and protease inhibitors (« Complete » protease inhibitor mixture, Roche Applied Science), and 10 times dounced (potter). After 30 min incubation with lysis buffer, and after sonication (cycles of 6 seconds ON / 6 seconds OFF, amplitude 40%, during 1 minute), cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. The total protein concentration was determined in the supernatant using the Bradford Protein-assay (Bio-Rad).

100-200 µg proteins were separated by SDS-PAGE (8-15%) and transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman, Protran). Free binding sites were blocked with 5 % non-fat dry milk, 0.2 % Tween 20 in Tris Buffer Saline 1X pH 7.6 (blocking buffer). The membranes were probed with various primary antibody (anti-OPA1 (1/300, BD-Biosciences), anti-actin (1/25000, Chemicon), anti-HSP60 (1/8000, Sigma), anti-citrate synthase (1/3000, Abcam), anti-OXPHOS (1/200, Mitosciences), anti-NDUFB4 (1/500, Mitosciences), anti-NDUFA9 (1/100, Mitosciences), anti-SDHA (1/1000, Abcam), anti-Core 1 (1/500, Invotrogen), anti-COXIV (1/250, Cell Signaling Technology), anti-ATP5C1 (1/500, Abgent), anti-ATP5H (1/2000, Abcam), anti-aconitase (1/500, Abcam), anti-SOD1 and anti-SOD2 (1/2000, Epitomics), anti-catalase (1/3000, Abcam)) and incubated overnight at 4°C in blocking buffer. After chemiluminescent detection of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1/10000, Abcam), scanned photographic films were analysed using ImageJ software.

## 5. Immunocytochemistry

HeLa cells were fixed for 20 min with PBS containing 3.7% formaldehyde and permeabilized for 5 min in PBS 1X, 0.25 % Triton<sup>TM</sup> X-100 and incubated for 10 min at -20°C with methanol prior to nuclear NRF2 detection. Non specific binding sites were blocked with 3 % BSA in PBS 1X for 15-30 min at room temperature. Cells were immunostained with rabbit polyclonal anti-NRF2 antibody (1/50, Santa Cruz Biotechnology) for 1h at 37°C.

Neurons were fixed for 15 min with 37°C PBS containing 3.7% formaldehyde and permeabilized for 15 min in PBS 1X, 1 % bovine serum albumin, 0.3 % Triton™ X-100 and for 10 min at -20°C in methano. Non specific sites were blocked for 1h in PBS containing 5 % normal goat serum, 3 % bovine serum albumin and 0,5 % Tween 20. Polyclonal antibodies against NRF2 (1/50, Santa Cruz Biotechnology) were incubated overnight at 4°C in blocking solution.

HeLa cells or neurons were then incubated with Alexa fluor 488-conjugated secondary antibodies (1/300, Molecular Probes), labelled with 0.25 µg/ml Hoechst in PBS 1X over 5 min and mounted in Mowiol. Immunolabelling was visualized under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i or Zeiss 710 Big) and images were acquired using NIS-Element (Nikon Digital Sight DUS2 camera) or ZEN 2011 software. HeLa cells with accumulation of NRF2 staining in nucleus were counted by stack with Hoechst labelling nucleus using ImageJ software. Nucleus raw integrated densities (sum of pixel values) of NRF2 by µm<sup>2</sup> in neurons were measured using ImageJ software and confocal images.

## 6. ROS measurement

Reactive oxygen species levels were measured using the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>-DCFDA, Molecular Probes) at 4 µM for 30 min at 37°C, in HeLa cells. Fluorescence intensities were measured at 493 nm by WALLAC VICTOR 1480 Multilabel Counter.

## 7. Aconitase activity

Aconitase activities in HeLa cells or neurons measurements were performed using a protocol already described in (37). The photochrome was measured at 525 nm using the UVIKON Spectrophotometer 922.

## 8. Glutathione levels

HeLa cells or neurons were lysed with 200 µl of 5 % metaphosphoric acid and then centrifuged 1,500 g at 4°C during 10 min. Final supernatant was used for glutathione assay (reduced

GSH and oxidized GSSG measurements) performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described in (38).

#### 9. Enzymatic antioxidant activities

Superoxide dismutase (SOD) activities (Mn SOD and Cu/Zn SOD) were assayed by using the inhibition of pyrogallol auto-oxidation on HeLa cell extracts as performed for aconitase activity. One enzymatic unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that inhibited pyrogallol auto-oxidation by 50 % (38). Catalase activity was determined by measuring decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm described in (38).

#### 10. Rotenone treatment and cellular viability

Acute rotenone-induced oxidative stress in transfected neuron primary cultures was performed at day 6 (DIV6) with rotenone (1h, 500 nM) (Sigma). Then, rotenone was removed and cells were incubated 3h with the same media prior rotenone incubation.

Viability of plated cortical cells was estimated using the Trypan blue exclusion essay (Sigma). siCtrl or siOPA1 transfected neurons, with or without rotenone treatment, were incubated in the presence of 0.2 % Trypan blue in PBS 1X for 3 min. Viable cells (blue negatives) and dead cells (blue positives) were estimated by counting under light microscope.

#### 11. Statistical analysis

Most of the experiments were statistically treated with Student's paired t-test because of the systematic comparison between control siRNA and siOPA1-treated HeLa cells or neurons. Oxygen consumption rates between siCtrl and siOPA1 treated HeLa cells and neurons were investigated using a nonparametric test (Mann-Whitney). Nucleus NRF2 raw integrated densities in control or OPA1 depleted-neurons were carried out with a nonparametric test (Mann-Whitney test). P values: p < 0,05\*, p < 0,01\*\*, p < 0,001\*\*\*.

## Acknowledgements

We thank Brice Ronsin for technical assistance with image J software and technical assistance in confocal analysis on the Toulouse RIO imaging platform. We thank Renée Ventura for the generous gift of transgenic mice and the animal core facility of CBD.

This project was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Paul Sabatier, Rétina-France, the Union Nationale Des Aveugles et Déficients Visuels, the “Gueules Cassées Sourire quand même” the “Association contre les Maladies Mitochondriales”.

A.M. was funded by the French Ministry for Research and Education and Rétina-France for PhD studies.

## References

1. Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchon, M.R. 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26:711-723.
2. Koopman, W.J., Distelmaier, F., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. 2013. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J* 32:9-29.
3. Carelli, V., La Morgia, C., Valentino, M.L., Barboni, P., Ross-Cisneros, F.N., and Sadun, A.A. 2009. Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta* 1787:518-528.
4. Amati-Bonneau, P., Milea, D., Bonneau, D., Chevrollier, A., Ferre, M., Guillet, V., Gueguen, N., Loiseau, D., de Crescenzo, M.A., Verny, C., et al. 2009. OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1855-1865.
5. Yu-Wai-Man, P., Trenell, M.I., Hollingsworth, K.G., Griffiths, P.G., and Chinnery, P.F. 2011. OPA1 mutations impair mitochondrial function in both pure and complicated dominant optic atrophy. *Brain* 134:e164.
6. Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., and Milea, D. 2012. Dominant optic atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 7:46.
7. Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy [In Process Citation]. *Nat Genet* 26:207-210.
8. Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., et al. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28 [In Process Citation]. *Nat Genet* 26:211-215.
9. Cohn, A.C., Toomes, C., Potter, C., Towns, K.V., Hewitt, A.W., Inglehearn, C.F., Craig, J.E., and Mackey, D.A. 2007. Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 143:656-662.



10. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Burke, A., Sellar, P.W., Clarke, M.P., Gnanaraj, L., Ah-Kine, D., Hudson, G., Czermin, B., Taylor, R.W., et al. 2010. The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Ophthalmology* 117:1538-1546, 1546 e1531.
11. Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., et al. 2008. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131:338-351.
12. Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., et al. 2008. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131:329-337.
13. Zeviani, M. 2008. OPA1 mutations and mitochondrial DNA damage: keeping the magic circle in shape. *Brain* 131:314-317.
14. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Gorman, G.S., Lourenco, C.M., Wright, A.F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M.L., Caporali, L., et al. 2010. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 133:771-786.
15. Spinazzi, M., Cazzola, S., Bortolozzi, M., Baracca, A., Loro, E., Casarin, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Casalena, G., Cenacchi, G., et al. 2008. A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. *Hum Mol Genet* 17:3291-3302.
16. Mackey, D.A., and Trousance, I. 2010. Genetics: Optic nerve genetics--more than meets the eye. *Nat Rev Neurol* 6:357-358.
17. Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., et al. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523:171-176.
18. Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Bliek, A.M. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279:18792-18798.
19. Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., and Endo, H. 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300:482-493.
20. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25:2966-2977.
21. Belenguer, P., and Pellegrini, L. 2013. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochim Biophys Acta* 1833:176-183.
22. Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278:7743-7746.
23. Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., et al. 2011. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* 21:12-20.
24. Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., et al. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126:177-189.
25. Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., et al. 2008. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131:352-367.
26. Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Manners, D., Testa, C., Malucelli, E., La Morgia, C., Barboni, P., Carbonelli, M., Schimpf, S., et al. 2004. Defective Mitochondrial Adenosine

- Triphosphate Production in Skeletal Muscle From Patients With Dominant Optic Atrophy Due to OPA1 Mutations. *Arch Neurol*.
27. Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.C., Courilleau, D., Guillou, E., et al. 2010. OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* 21:593-598.
  28. Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., and Votruba, M. 2007. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16:1307-1318.
  29. Alavi, M.V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H.F., Ruttiger, L., Beck, S.C., Tonagel, F., Pichler, B.J., et al. 2007. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130:1029-1042.
  30. Sarzi, E., Angebault, C., Seveno, M., Gueguen, N., Chaix, B., Bielicki, G., Boddaert, N., Mausset-Bonnefont, A.L., Cazevielle, C., Rigau, V., et al. 2012. The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain* 135:3599-3613.
  31. Kanazawa, T., Zappaterra, M.D., Hasegawa, A., Wright, A.P., Newman-Smith, E.D., Buttle, K.F., McDonald, K., Mannella, C.A., and van der Blik, A.M. 2008. The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* 4:e1000022.
  32. Tang, S., Le, P.K., Tse, S., Wallace, D.C., and Huang, T. 2009. Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 4:e4492.
  33. Shahrestani, P., Leung, H.T., Le, P.K., Pak, W.L., Tse, S., Ocorr, K., and Huang, T. 2009. Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* 4:e6867.
  34. Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J.J., Tse, S., Le, P.K., Nguyen, K., Brachmann, C.B., Wallace, D.C., and Huang, T. 2008. The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in *Drosophila* model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet* 4:e6.
  35. Yen, M.Y., Wang, A.G., and Wei, Y.H. 2006. Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res* 25:381-396.
  36. Yan, M.H., Wang, X., and Zhu, X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 62:90-101.
  37. Colombani, A.L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Offer, G., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., et al. 2009. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58:2189-2197.
  38. Galinier, A., Carriere, A., Fernandez, Y., Carpenne, C., Andre, M., Caspar-Bauguil, S., Thouvenot, J.P., Periquet, B., Penicaud, L., and Casteilla, L. 2006. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J Biol Chem* 281:12682-12687.
  39. Agier, V., Oliviero, P., Laine, J., L'Hermitte-Stead, C., Girard, S., Fillaut, S., Jardel, C., Bouillaud, F., Bulteau, A.L., and Lombes, A. 2012. Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim Biophys Acta* 1822:1570-1580.
  40. Van Bergen, N.J., Crowston, J.G., Kearns, L.S., Staffieri, S.E., Hewitt, A.W., Cohn, A.C., Mackey, D.A., and Trounce, I.A. 2011. Mitochondrial oxidative phosphorylation compensation may preserve vision in patients with OPA1-linked autosomal dominant optic atrophy. *PLoS One* 6:e21347.
  41. Chen, C., Fossar, N., Weil, D., Guillaud-Bataille, M., Danglot, G., Raynal, B., Dautry, F., Bernheim, A., and Brison, O. 2005. High frequency trans-splicing in a cell line producing

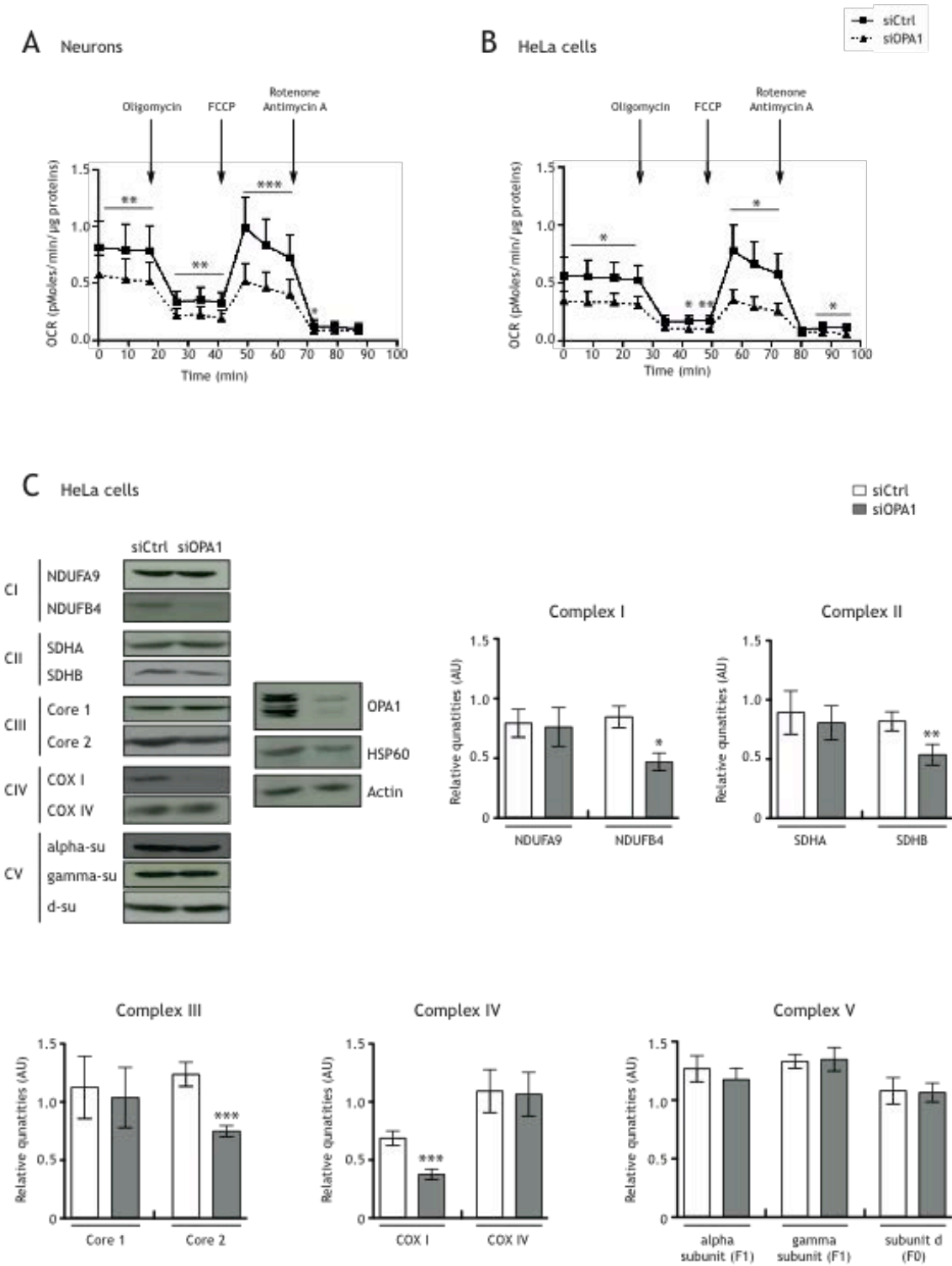
- spliced and polyadenylated RNA polymerase I transcripts from an rDNA-myc chimeric gene. *Nucleic Acids Res* 33:2332-2342.
42. Bertholet, A.M., Millet, A.M., Guillermin, O., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.C., and Belenguer, P. 2013. OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. *Brain* 136:1518-1533.
  43. Vincent, A.M., McLean, L.L., Backus, C., and Feldman, E.L. 2005. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J* 19:638-640.
  44. Gardner, P.R., Nguyen, D.D., and White, C.W. 1994. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12248-12252.
  45. Kelly, M., Trudel, S., Brouillard, F., Bouillaud, F., Colas, J., Nguyen-Khoa, T., Ollero, M., Edelman, A., and Fritsch, J. 2010. Cystic fibrosis transmembrane regulator inhibitors CFTR(inh)-172 and GlyH-101 target mitochondrial functions, independently of chloride channel inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 333:60-69.
  46. Berndt, N., Holzhutter, H.G., and Bulik, S. 2013. Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: a model-based analysis. *FEBS J*.
  47. Freestone, P.S., Chung, K.K., Guatteo, E., Mercuri, N.B., Nicholson, L.F., and Lipski, J. 2009. Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons--involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Eur J Neurosci* 30:1849-1859.
  48. Brustovetsky, T., Brittain, M.K., Sheets, P.L., Cummins, T.R., Pinelis, V., and Brustovetsky, N. 2011. KB-R7943, an inhibitor of the reverse Na<sup>+</sup> /Ca<sup>2+</sup> exchanger, blocks N-methyl-D-aspartate receptor and inhibits mitochondrial complex I. *Br J Pharmacol* 162:255-270.
  49. Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., and Taylor, S.S. 2011. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* 286:2918-2932.
  50. Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.A., Verny, C., Ferre, M., Dollfus, H., Odent, S., Milea, D., et al. 2008. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63:794-798.
  51. Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. 2004. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13:805-815.
  52. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C.T. 2006. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26:4872-4881.
  53. Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J.H., Park, J.S., Manfredi, G., Hu, P., Lu, J., and Bai, Y. 2007. An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 282:17557-17562.
  54. Acin-Perez, R., and Enriquez, J.A. 2014. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 1837:444-450.
  55. Vartak, R., Porras, C.A., and Bai, Y. 2013. Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4:582-590.
  56. Lenaz, G., and Genova, M.L. 2012. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 748:107-144.
  57. Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155:160-171.

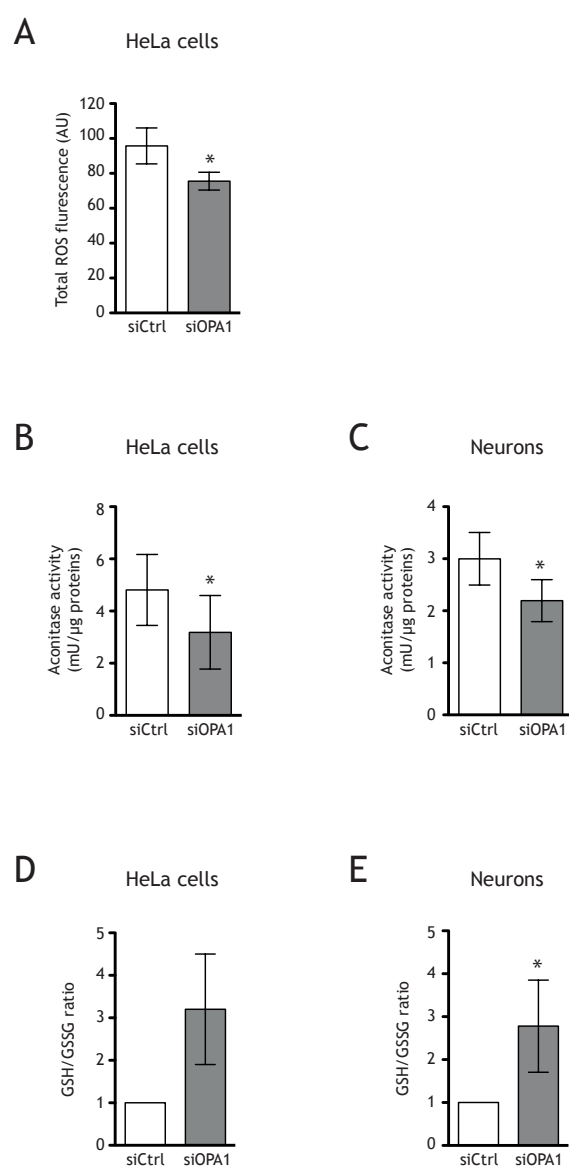
58. Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. 2014. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 19:630-641.
59. Ma, Q. 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:401-426.
60. Nguyen, D., Alavi, M.V., Kim, K.Y., Kang, T., Scott, R.T., Noh, Y.H., Lindsey, J.D., Wissinger, B., Ellisman, M.H., Weinreb, R.N., et al. 2011. A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics. *Cell Death Dis* 2:e240.
61. Ham, W.T., Jr., Mueller, H.A., and Sliney, D.H. 1976. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature* 260:153-155.
62. Bennet, D., Kim, M.G., and Kim, S. 2013. Light-induced anatomical alterations in retinal cells. *Anal Biochem* 436:84-92.
63. Ji, D., Li, G.Y., and Osborne, N.N. 2008. Nicotinamide attenuates retinal ischemia and light insults to neurones. *Neurochem Int* 52:786-798.
64. Ham, W.T., Jr., Mueller, H.A., Ruffolo, J.J., Jr., Guerry, D., 3rd, and Guerry, R.K. 1982. Action spectrum for retinal injury from near-ultraviolet radiation in the aphakic monkey. *Am J Ophthalmol* 93:299-306.
65. Jarrett, S.G., Lewin, A.S., and Boulton, M.E. 2010. The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Res* 44:179-190.
66. Sacca, S.C., Roszkowska, A.M., and Izzotti, A. 2013. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutat Res* 752:153-171.
67. Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. 2011. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333:1109-1112.
68. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817-833.
69. Kienhofer, J., Haussler, D.J., Ruckelshausen, F., Muessig, E., Weber, K., Pimentel, D., Ullrich, V., Burkle, A., and Bachschmid, M.M. 2009. Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents. *FASEB J* 23:2034-2044.
70. Escames, G., Lopez, L.C., Garcia, J.A., Garcia-Corzo, L., Ortiz, F., and Acuna-Castroviejo, D. 2012. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet* 131:161-173.
71. Schriener, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., et al. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308:1909-1911.
72. Lopez-Armada, M.J., Riveiro-Naveira, R.R., Vaamonde-Garcia, C., and Valcarcel-Ares, M.N. 2013. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion* 13:106-118.
73. Qi, X., Sun, L., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., and Guy, J. 2007. Use of mitochondrial antioxidant defenses for rescue of cells with a Leber hereditary optic neuropathy-causing mutation. *Arch Ophthalmol* 125:268-272.
74. Bessero, A.C., and Clarke, P.G. 2010. Neuroprotection for optic nerve disorders. *Curr Opin Neurol* 23:10-15.
75. Keum, Y.S., Jeong, W.S., and Kong, A.N. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* 555:191-202.
76. Surh, Y.J., Kundu, J.K., Na, H.K., and Lee, J.S. 2005. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* 135:2993S-3001S.
77. Son, T.G., Camandola, S., and Mattson, M.P. 2008. Hormetic dietary phytochemicals. *Neuromolecular Med* 10:236-246.

78. Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768-780.
79. Kohle, C., and Bock, K.W. 2006. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 72:795-805.
80. Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G., and Andersen, M.E. 2010. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:84-97.
81. Barboni, P., Valentino, M.L., La Morgia, C., Carbonelli, M., Savini, G., De Negri, A., Simonelli, F., Sadun, F., Caporali, L., Maresca, A., et al. 2013. Idebenone treatment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. *Brain* 136:e231.
82. Geromel, V., Darin, N., Chretien, D., Benit, P., DeLonlay, P., Rotig, A., Munnich, A., and Rustin, P. 2002. Coenzyme Q(10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits. *Mol Genet Metab* 77:21-30.
83. Haefeli, R.H., Erb, M., Gemperli, A.C., Robay, D., Courdier Fruh, I., Anklin, C., Dallmann, R., and Gueven, N. 2011. NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS One* 6:e17963.

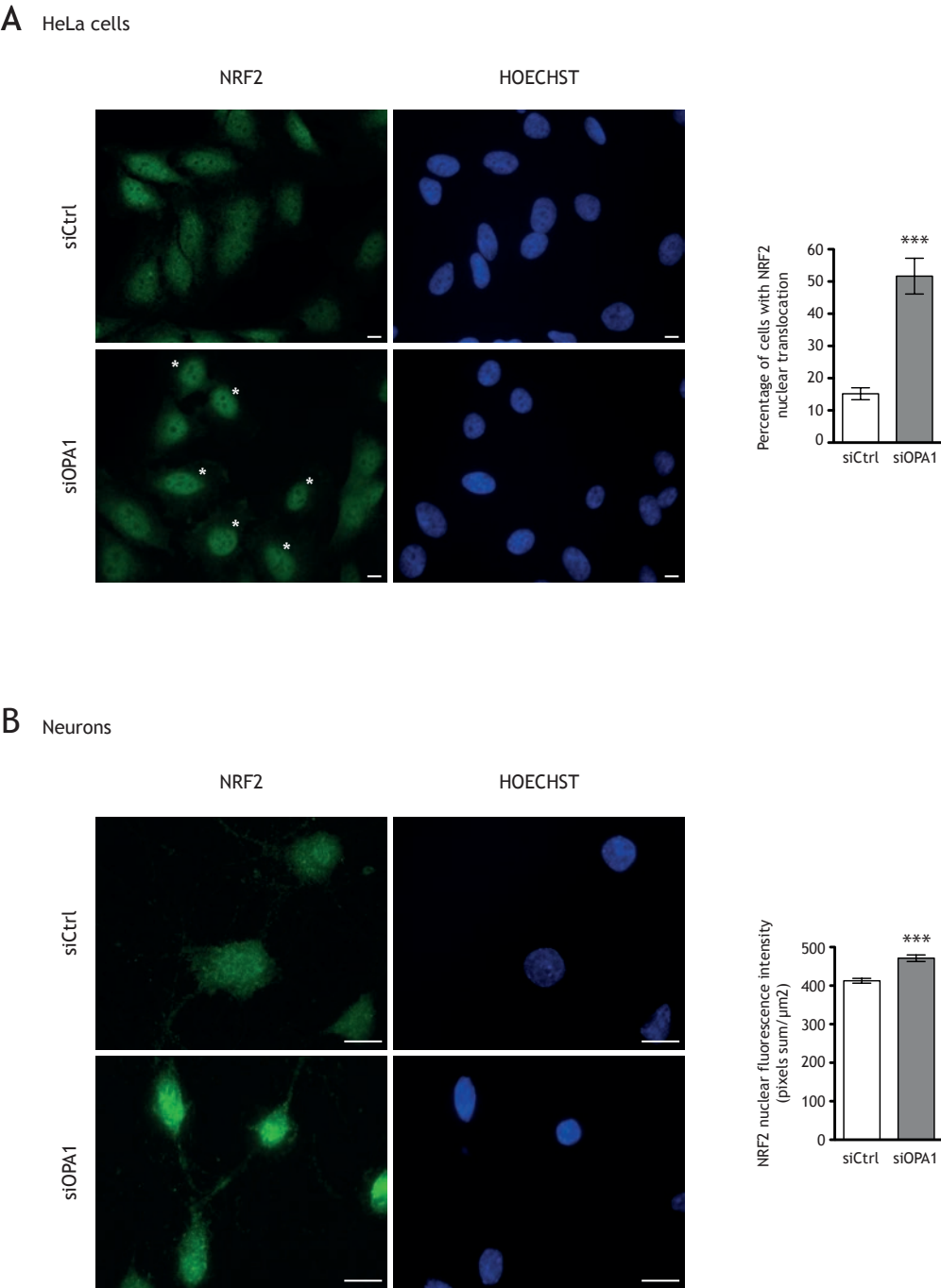
## Figures

Millet *et al.* Figure 1

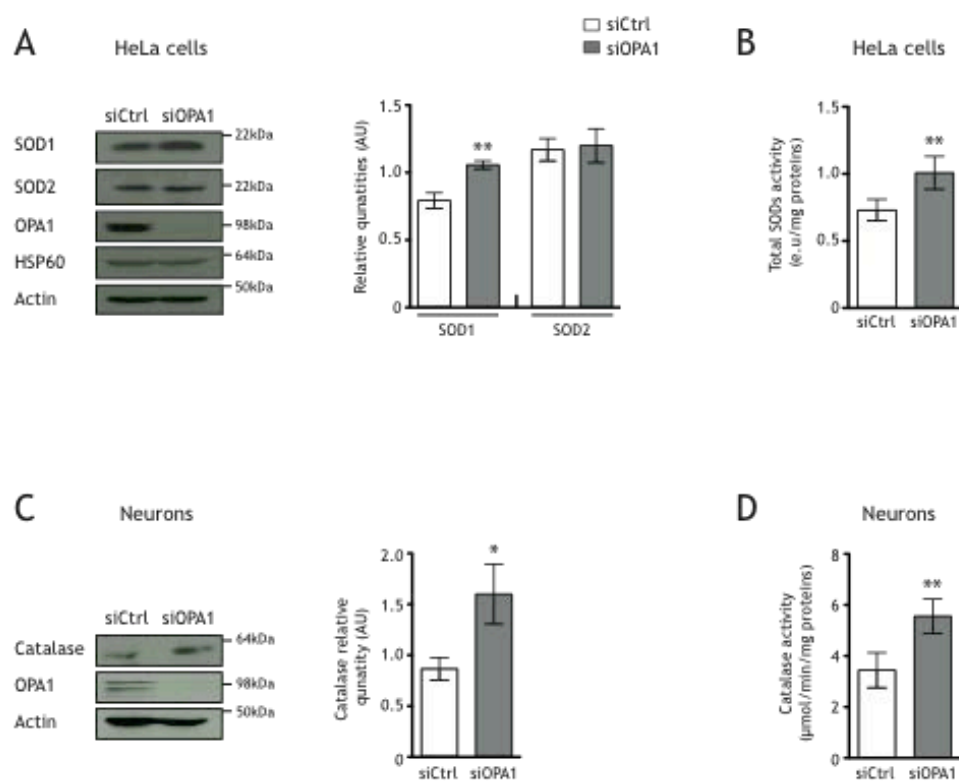


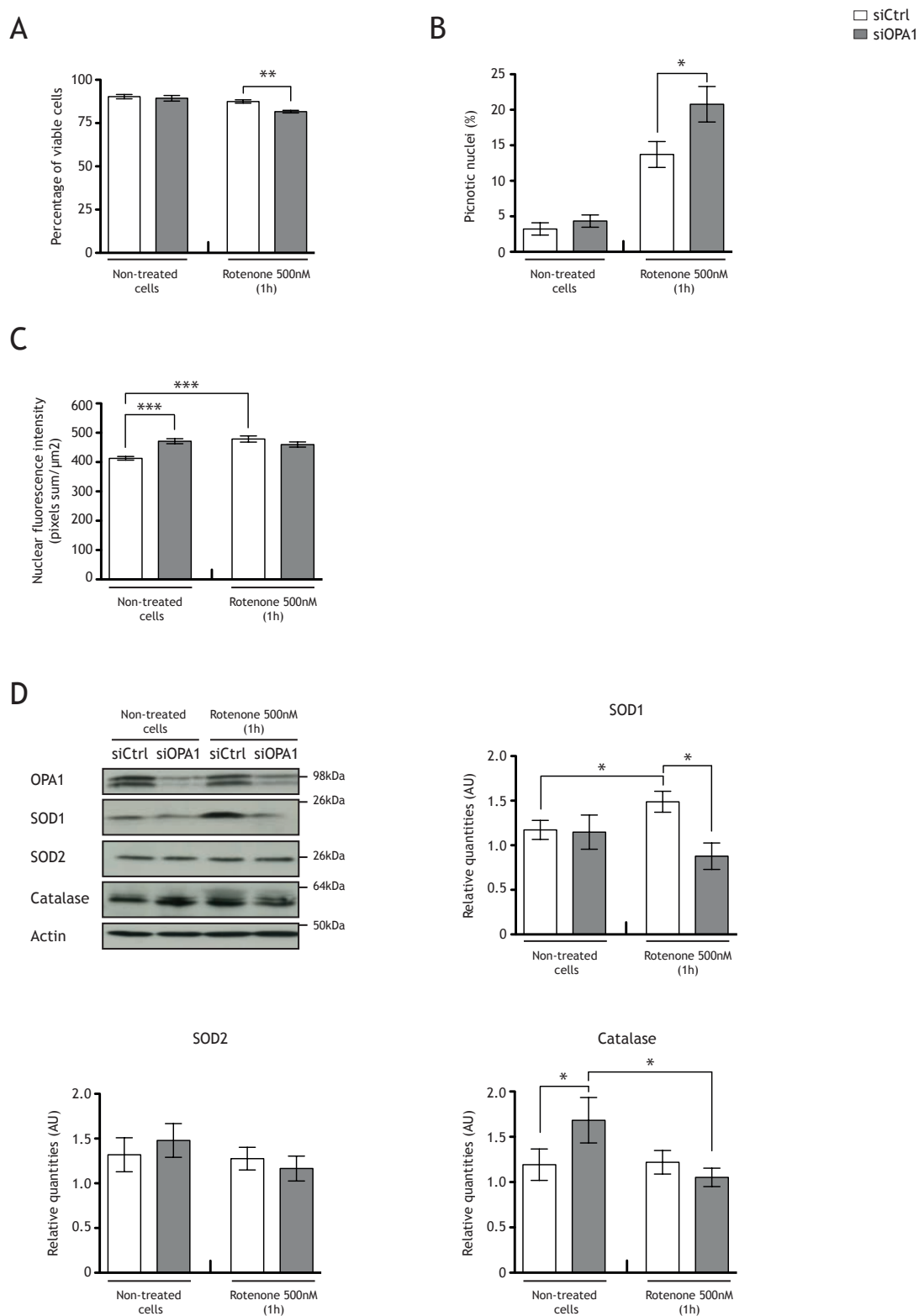
Millet *et al.* Figure 2

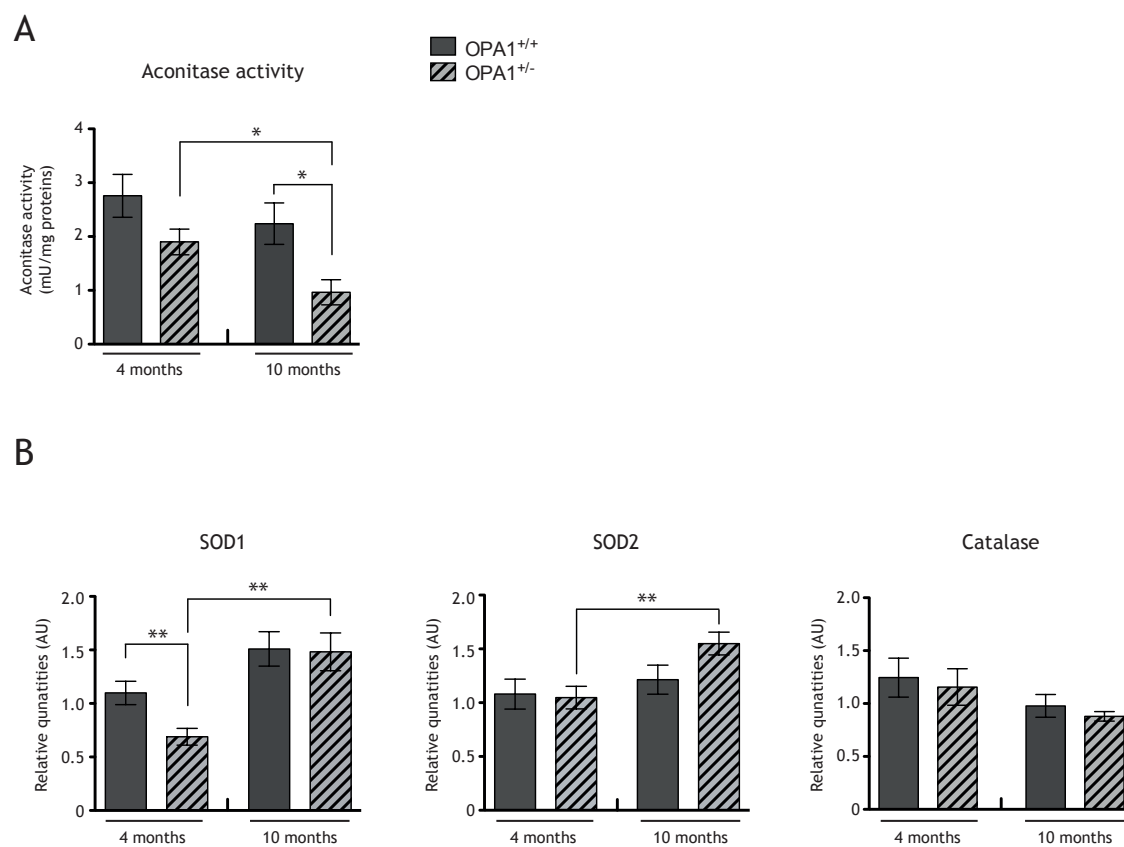
Millet *et al.* Figure 3

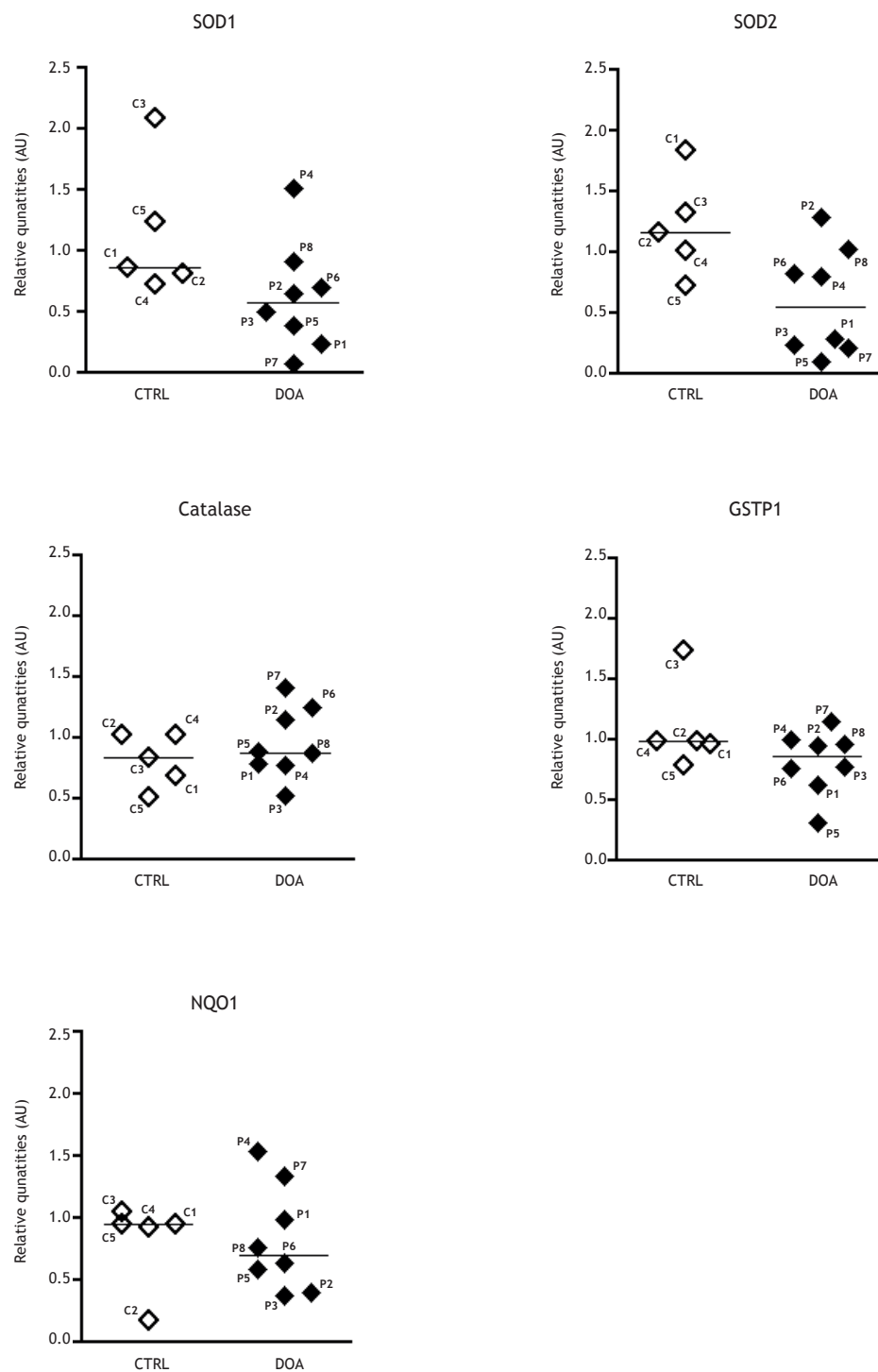




Millet *et al.* Figure 4

Millet *et al.* Figure 5

Millet *et al.* Figure 6

Millet *et al.* Figure 7

Millet et al., Table 1

Healthy volunteers	Age (year)	Gender	-	-	-	-
C1	43	M	-	-	-	-
C2	28	M	-	-	-	-
C3	25	F	-	-	-	-
C4	new born	M	-	-	-	-
C5	-	-	-	-	-	-
DOA patients	Age (year)	Gender	DNA change/variant 1	Protein mutation	Exon	Disease (symptoms)
P1	20	M	c.1770 G>C	splicing defect p?	Exon 18	DOA
P2	11	F	c.1334 G>A	p.R445H	Exon 14	DOA 'plus' syndrome with deafness
P3	16	F	c.1146 A>G	p.I382M	Exon 12	DOA and deafness
P4	51	F	c.2708_2711del	p.(Val903Glyfs*3)	Exon 27	DOA
P5	30	F	c.1334 G>A	p.R445H	Exon 14	DOA 'plus' syndrome with deafness
P6	44	M	c.1937 C>T	p.S646L	Exon 20	DOA and multiple sclerosis
P7	10	M	c.1146 A>G	p.I382M	Exon 12	DOA and ataxia
P8	35	M	c.1635 C>G	p.S545R	Exon 17	DOA 'plus' syndrome and ataxia

## Figures legends

### Figure 1 – OPA1 down-regulation affects mitochondrial respiratory chain activity and quantity

**(A)** Oxygen consumption rates (OCR) were measured at 6 days *in vitro* (DIV6) in neurons transfected with control small interfering RNA (siCtrl, black line) or small interfering RNA against OPA1 (siOPA1, dotted line). Spontaneous mitochondrial respiration is significantly lower in siOPA1-transfected neurons ( $0.50 \pm 0.05$ ) than in control ( $0.74 \pm 0.09$ ). After oligomycin ( $0.6 \mu\text{M}$ ) injection, cell respiration is also significantly lower in siOPA1-transfected neurons ( $0.33 \pm 0.04$ ) than in siCtrl-transfected cells ( $0.5 \pm 0.06$ ). After FCCP ( $6 \mu\text{M}$ ) injection, maximal respiration is significantly lower in neurons down-regulated for OPA1 ( $0.41 \pm 0.08$ ) than in control cells ( $0.76 \pm 0.11$ ). Finally, rotenone ( $50 \text{ nM}$ ) and antimycin A ( $0.182 \mu\text{M}$ ) injections inhibit mitochondrial respiration. Results are expressed as Mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). P values were determined by Student's unpaired t-test ( $p<0.01^{**}$  and  $p<0.001^{***}$ ). **(B)** OCR were measured in HeLa cells transfected with siOPA1 and siCtrl. Spontaneous mitochondrial respiration is significantly lower in HeLa cells transfected with siOPA1 ( $0.26 \pm 0.04$ ) compared to control cells ( $0.42 \pm 0.06$ ). After oligomycin ( $0.6 \mu\text{M}$ ) injection, cell respiration is also significantly lower in siOPA1-transfected cells ( $0.22 \pm 0.03$ ) than in control cells ( $0.37 \pm 0.05$ ). After FCCP ( $6 \mu\text{M}$ ) injection maximal respiratory is significantly lower in HeLa cells down-regulated for OPA1 ( $0.23 \pm 0.04$ ) than in control cells ( $0.55 \pm 0.11$ ). Finally, rotenone ( $50 \text{ nM}$ ) and antimycin A ( $0.182 \mu\text{M}$ ) injections inhibit mitochondrial respiration. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). P values were determined by Student's unpaired t-test  $p<0.05^{*}$  and  $p<0.01^{**}$ . **(C)** Immunoblots and representative histograms showing the effect of OPA1 down-regulation in HeLa

cells on levels of two subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes (complex I-IV) and three subunits of ATP synthase (complex V) relative to HSP60 (AU: Arbitrary Units, Mean  $\pm$  SEM, n=7 to n=10). NDUFB4 (n=10) quantity is significantly lower in siOPA1-transfected HeLa cells (0.47  $\pm$  0.07) than in siCtrl-transfected cells (0.85  $\pm$  0.09). SDHB (n=10) quantity is significantly lower in siOPA1 treated HeLa cells (0.68  $\pm$  0.16) than in control cells (0.96  $\pm$  0.16). Core 2 (n=10) level is significantly decreased in siOPA1 treated cells (0.75  $\pm$  0.05) than in control cells (1.238  $\pm$  0.10). COX I (n=10) is decreased in siOPA1-transfected cells (0.37  $\pm$  0.05) than in control cells (0.69  $\pm$  0.06). P values were determined by Student's-paired t-test ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ).

### Figure 2 – Imbalance of redox state in OPA1 down-regulated cells

**(A)** Total ROS measured by H<sub>2</sub>DCFDA probe in HeLa cells transfected with siOPA1 (72.63  $\pm$  4.6) is lower than in siCtrl treated cells (95.48  $\pm$  9.1). Aconitase activity **(B)** is lower in siOPA1-treated HeLa cells (3.185  $\pm$  1.41) when compared to siCtrl-treated cells (4.811  $\pm$  1.361) and **(C)** in neurons depleted for OPA1 (2.2  $\pm$  0.4) when compared to control cells (3.0  $\pm$  0.5). Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels are observed in HeLa cells **(D)** and neurons **(E)** transfected with siOPA1 (grey), compared to control cells (white). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=4 (D,E) to n=5 (A,B,C). P values were determined by Student's-paired t-test  $p < 0.05^*$  and nonparametric test (Mann-Whitney) for ROS fluorescence analysis (A).

### Figure 3 – OPA1 down-regulation induces the nuclear translocation of the transcription factor NRF2

**(A)** Representative micrographs of NRF2 (green) immunocytofluorescence and DNA Hoechst staining (blue) in siOPA1 or siCtrl-treated HeLa cells. Histogram represented percentages of cells with NRF2 nuclear translocation (300-400 cells per condition). Nuclear immunostaining of NRF2 is observed in 15.18  $\pm$  1.86 % of control HeLa cells and in 51.68  $\pm$  5.57 % of siOPA1-treated cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with (n=14). P values were determined by a nonparametric test (Mann-Whitney test),  $p < 0.001^{***}$ . **(B)** Representative micrographs of NRF2 (green) immunocytofluorescence and DNA Hoechst staining (blue) in siOPA1 or siCtrl-treated neurons. Histogram represented nuclear fluorescence intensity (pixels sum/ $\mu\text{m}^2$ ) determined by ImageJ software of NRF2, which is higher in siOPA1-treated neurons (471.4  $\pm$  8.5) than in control cells (412.8  $\pm$  6.17). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with (750-850 cells per condition n=5). P values were determined by a nonparametric test (Mann-Whitney test),  $p < 0.001^{***}$ . Scale bar: 10 $\mu\text{m}$ .

### Figure 4 – Proteins levels of NRF2 targets are increased in OPA1-depleted cells

Representative immunoblots and relative quantities of SOD1 and SOD2 in HeLa cells and neurons **(A)**. SOD1 quantity is increased in siOPA1-transfected HeLa cells (1.05  $\pm$  0.03) compared to siCtrl-treated cells (0.79  $\pm$  0.05). **(B)** Total SODs activity (SOD1 and SOD2) is increased in HeLa cells after siOPA1 transfection (1.008  $\pm$  0.12) compared to control cells (0.73  $\pm$  0.08). **(C)** Catalase quantity is increased in siOPA1 (1.6  $\pm$  0.33) when compared to siCtrl-treated neurons (0.85  $\pm$  0.14). **(D)** Catalase activity is increased in neurons transfected with siOPA1 (5.563  $\pm$  0.66) when compared to



siCtrl (3.441  $\pm$  0.69). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=5 (C,D) to n=8 (A,B). Statistical significance was determined by Student's-paired t-test  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ .

**Figure 5 – Acute oxidative stress challenges viability of siOPA1-treated neurons, which are unable to induce NRF2 pathway**

**(A)** Trypan blue exclusion assay were performed 3h after acute rotenone treatment (1h, 500nM) in neurons transfected with (grey) or without siOPA1 (white). Viable cells, which exclude the colouring agent are lower in siOPA1 neurons treated with rotenone (81.63  $\pm$  0.76 %) than in control cells treated with rotenone (87.5  $\pm$  0.93 %). **(B)** Percentage of picnotic nuclei determined after Hoechst staining is higher in siOPA1 (grey) or siCtrl-treated neurons (white), with or without acute rotenone treatment (1h, 500nM) **(C)** Histogram represented nuclear fluorescence intensity of NRF2 (pixels  $\mu\text{m}^2$ ) estimated using Image J software, which is higher in siOPA1-treated neurons (471.4  $\pm$  8.5) than in control cells (412.8  $\pm$  6.17) without rotenone treatment. After 1h rotenone incubation and 3h in reconditioning medium, NRF2 nuclear fluorescence intensity is increased in control condition (478.7  $\pm$  10.45) but not in siOPA1-transfected neurons (459.9  $\pm$  8.852). **(D)** Representative immunoblots and histograms of SOD1 (n=8), SOD2 (n=8) and catalase (n=7) proteins quantities relative to actin in neurons after siOPA1 (grey) or siCtrl-transfection (white), with or without acute rotenone treatment (500nM, 1h). Rotenone treatment doesn't change SOD2 quantities in control or siOPA1-treated cells. Upon acute stress, SOD1 quantity is increased in siCtrl-transfected neurons (without rotenone: 1.173  $\pm$  0.1068; with rotenone: 1.488  $\pm$  0.1174), but not

in siOPA1-transfected cells (without rotenone: 1.148 +/- 0.1917; with rotenone: 0.8771 +/- 0.1487). Catalase protein level is decreased after rotenone treatment in siOPA1-transfected neurons (without rotenone: 1.683 +/- 0.2505; with rotenone: 1.052 +/- 0.1019) and is unchanged in siCtrl transfected cells (without rotenone: 1.193 +/- 0.17; with rotenone: 1.219 +/- 0.13). Results are expressed as mean +/- SEM with n=4 (A), at least 100 nuclei per conditions n=4 (B); 750-850 cells per condition n=5 (C) n=7-8 (D). Statistical significance was determined by Student's-paired t-test (A, B) and a nonparametric test (Mann-Whitney) (C); for D: siCtrl versus siOPA1 with or without rotenone treatment Student's-paired t-test and for rotenone treated and non treated siCtrl cells, Student's-unpaired t-test, for rotenone treated and non treated siOPA1 cells, Student's-unpaired t-test  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

**Figure 6 – The redox state is imbalanced in DOA mice models (*OPA1*<sup>+/-</sup>)**

**(A)** Aconitase activities measured by colorimetric assay in cortices of 4 (n=10) and 10 (n=6) months old *OPA1*<sup>+/-</sup> (striped) and *OPA1*<sup>+/+</sup> control mice (grey) cortices. Aconitase activity is significantly lower at 10 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (0.97 +/- 0.23) compared to 10 months old control *OPA1*<sup>+/+</sup> mice (2.24 +/- 0.38). Aconitase activity is decreased in cortices of 10 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (0.97 +/- 0.23) compared to 4 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (1.90 +/- 0.24). **(B)** SOD1, SOD2 and catalase protein quantities relative to actin were measured in 4 (n=10) and 10 (n=6) months old *OPA1*<sup>+/-</sup> and *OPA1*<sup>+/+</sup> mice cortices. SOD1 quantity is lower in cortices of 4 months old mutant mice *OPA1*<sup>+/-</sup> (0.69 +/- 0.08) compared to *OPA1*<sup>+/+</sup> mice (1.10 +/- 0.11). SOD1 quantity is increased in cortices of 10 months old

*OPA1*<sup>+/-</sup> mice (1.48 +/- 0.18) compared to 4 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (0.69 +/- 0.08). SOD2 quantity is increased in cortices of 10 months old mutant mice (1.55 +/- 0.11) compared to 4 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (1.05 +/- 0.11). Results are expressed as mean +/- SEM with n=10 4 months old mice and n=6 for 10 months old mice. Statistical significance was determined by Student's unpaired t-test and a nonparametric test (Mann-Whitney) p<0.05\*, p<0.01\*\*.

### **Figure 7 – Antioxidant defences levels in fibroblasts from DOA patients**

SOD1, SOD2, catalase, GSTP1 and NQO1 proteins levels were quantified by immunoblot in five healthy volunteer's skin fibroblasts (CTRL, C1-C5) and eight DOA patient's skin fibroblasts (DOA, P1-P8). SOD1 CTRL: 1.15 +/- 0.25; SOD1 DOA: 0.62 +/- 0.16; SOD2 CTRL: 1.21 +/- 0.19; SOD2 DOA: 0.59 +/- 0.16; catalase CTRL: 0.82 +/- 0.10; catalase DOA: 0.96 +/- 0.10; GSTP1 CTRL: 1.10 +/- 0.17; GSTP1 DOA: 0.82 +/- 0.09; NQO1 CTRL: 0.81 +/- 0.16; NQO1 DOA: 0.83 +/- 0.15. Results are expressed as mean +/- SEM with n=3-6 per DOA and CTRL fibroblasts.

### **Table 1 – Clinical symptoms and mutations of DOA patients**

## Methods (Supplemental Data)

### 1. Total intracellular ATP level

ATP measurements in HeLa cells were determined using the ATP Colorimetric/Fluorometric Assay kit (Abcam). ATP intracellular levels were performed with the colorimetric assay, following the manufacturer's instructions, on  $1.10^6$  HeLa cells transfected with small interfering RNA control or against OPA1. ATP contents were measured in duplicate (570 nm) and calculated per microgram of proteins.

ATP and ADP measurements in siOPA1 or siCtrl transfected neurons were determined using a bioluminescence technique with an ATP monitoring kit (Anne Devin et al. 2006).

### 2. $\text{NAD}^+$ and NADH, $\text{H}^+$ levels

Intracellular  $\text{NAD}^+$  and NADH levels in HeLa cells were measured with an  $\text{NAD}^+$ /NADH Assay kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $2.10^6$  HeLa cells were transfected with small interfering RNA control or against OPA1. Cells were washed with cold PBS and extracted with NADH/NAD extraction buffer by two freeze/thaw cycles (20 min on dry ice and then 10 min at room temperature). Total NAD (NADt) and NADH levels were detected in a 96-well plate, and color was developed and read at 450 nm.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio was calculated as  $(\text{NADt} - \text{NADH})/\text{NADH}$ .

### 3. TCA cycle enzymes activities

Activities were evaluated in HeLa cells transfected with siCtrl or siOPA1 lysates.

Citrate synthase activity was determined by measurement of TNB produced by the reaction of CoA-SH and 5'5 dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB). 930  $\mu\text{l}$  of reaction media (100  $\mu\text{M}$  DTNB, 100 mM TrisHCl pH 8.0, 300  $\mu\text{M}$  acetyl-CoA, 500  $\mu\text{M}$  oxaloacetate, 0,1 % Triton X-100) and 40  $\mu\text{g}$  of proteins were measured at 412 nm (37°C). Reactions start after adding 50  $\mu\text{l}$  of 10 mM oxaloacetic acid diluted in 100 mM Tris HCl pH 8.1.

Succinate dehydrogenase activity was evaluated by the reduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP). Complex III activity was inhibited by antimycin to impair the ubiquinone reduction and reverse electron flow was stopped by rotenone, a complex I inhibitor. 976  $\mu$ l of reaction media (25 mM K Phosphate pH 7.5, 20 mM succinate, 100  $\mu$ M decylubiquinone, 50  $\mu$ M DCPIP, 1 mM KCN, 5  $\mu$ M rotenone, 12.5  $\mu$ g/mL antimycin A, 2 mg/ml BSA) and 40  $\mu$ g of proteins were measured at 600 nm (37°C). Reactions start after adding 4  $\mu$ l of 25 mM decylubiquinone.

Fumarase is a reversible enzyme, which produce fumarate or malate. In presence of a high concentration of malate, fumarase activity is determined by the production of fumarate. 930  $\mu$ l of reaction media (100 mM K PO<sub>4</sub>, 50 mM malate) and 60  $\mu$ g of proteins were measured at 250 nm (37°C). Reactions start after adding 50  $\mu$ l of 1M malate and 500 mM K phosphate pH 7.4.

Malate dehydrogenase activity was measured in 965  $\mu$ l of reaction media (50 mM sodium phosphate, 5 mM trisodium DL-isocitrate) and 60  $\mu$ g proteins at 240 nm (37°C). Reactions start after adding 5  $\mu$ l of 1 M isocitrate.

#### 4. Extracellular lactate levels

Lactate extracellular measurements were performed with a kit (BioMérieux). Lactate was measured in media supernatants (1/10 dilution) of 72h HeLa cells transfected with siCtrl or siOPA1 at 505 nm, following the manufacturer's instructions.

#### 5. Immunoblot

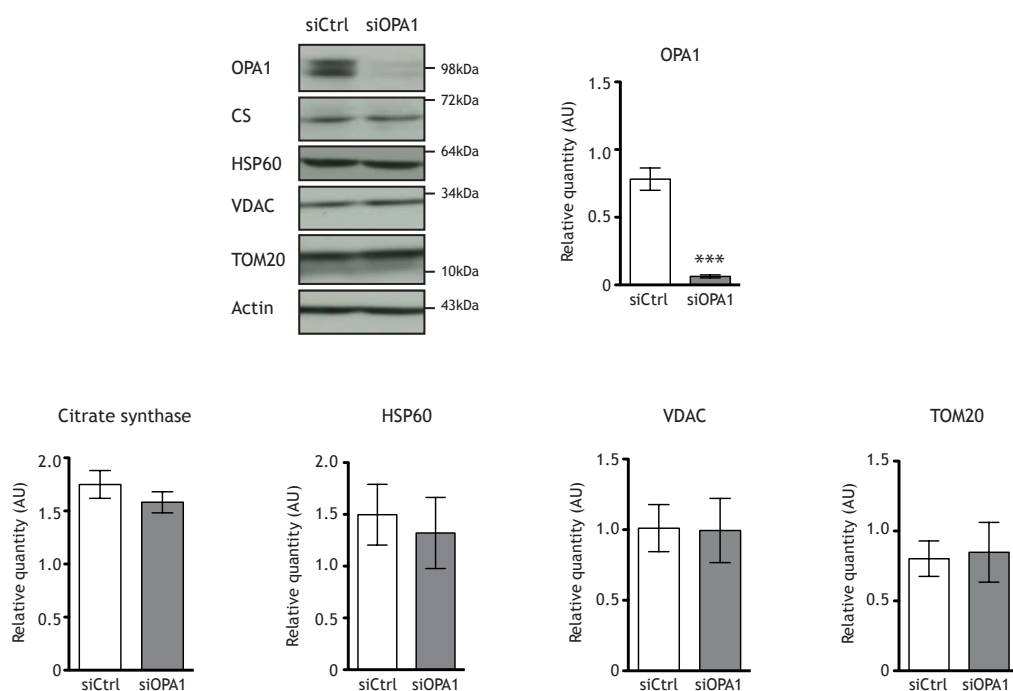
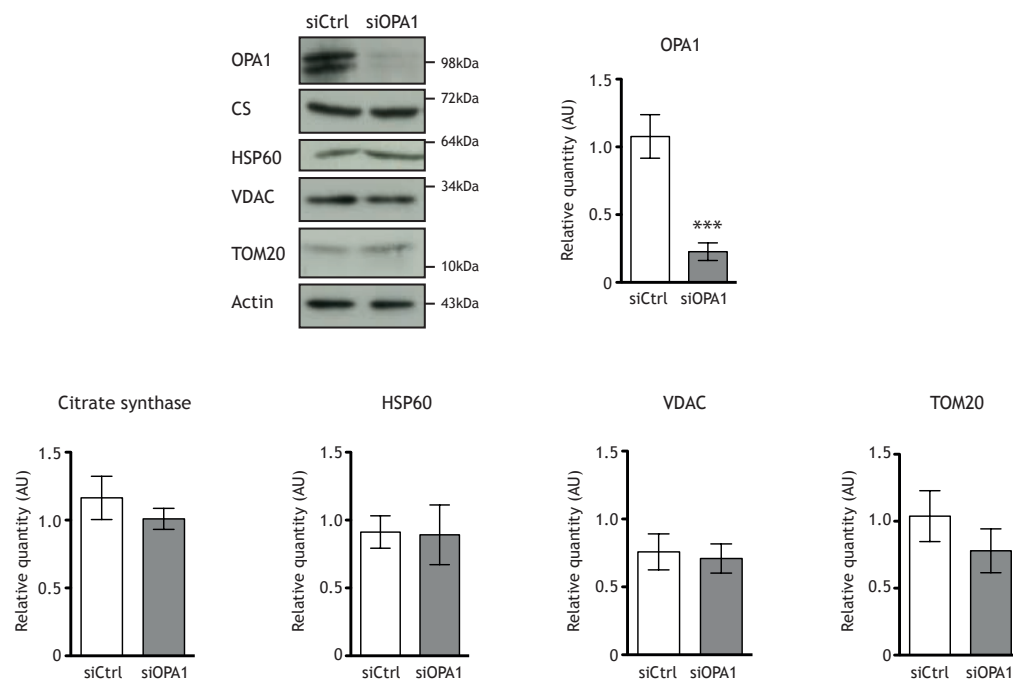
Primary antibodies used for immunoblots: anti-NQO1 (1/3000, Abcam), anti-GSTP1 (1/8000, Oxford Biochemical Research), anti-ferritin heavy chain (1/500, Abcam) and anti-ferritin light chain (1/4000, Abcam).

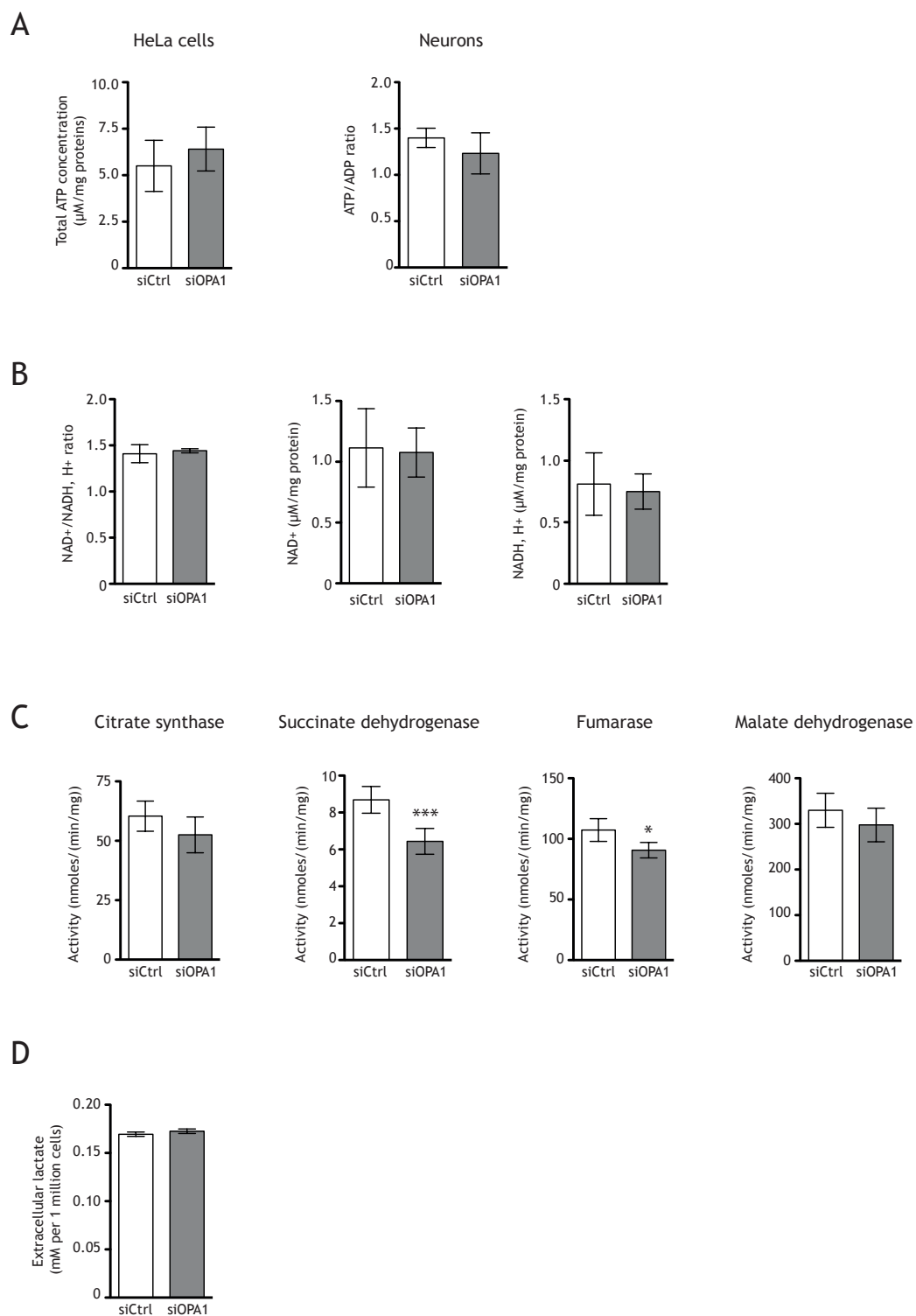
#### 6. Kinetic of NRF2 nuclear translocation

After fixation and permeabilization, HeLa cells were incubated with primary antibodies against NRF2 (1/50, Santa Cruz Biotechnology) and Alexa fluor 488-conjugated secondary antibodies (1/300, Molecular Probes). Immunolabelling of HeLa cells 66h, 67h, 68h, 69h, 70h, and 72h after siControl and siOPA1 transfection was visualized under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i) and images were acquired using NIS-Element (Nikon Digital Sight DUS2 camera). HeLa cells with accumulation of NRF2 staining in nucleus were counted by stack with Hoechst labelling nucleus using ImageJ software.

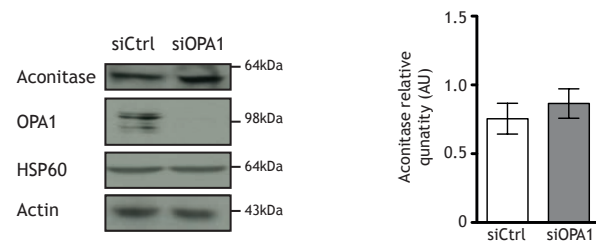
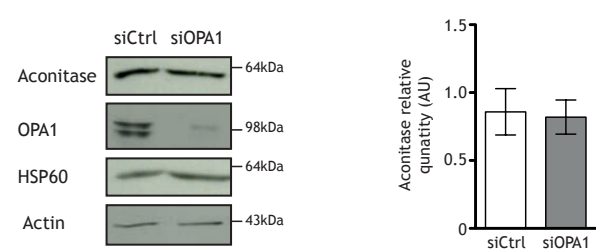
#### 7. Chronic rotenone treatment and cellular viability

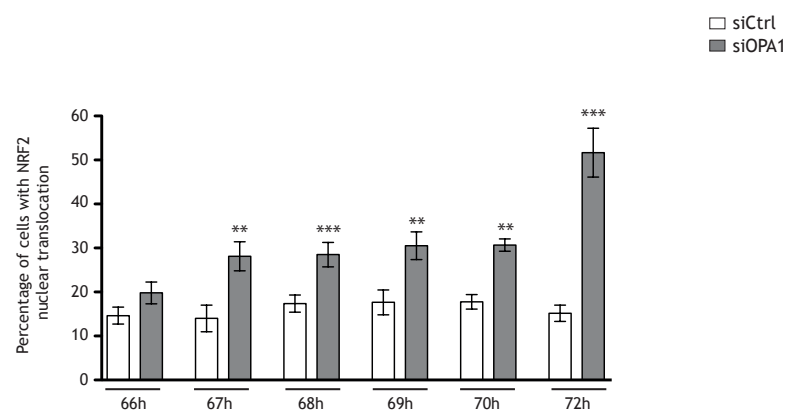
Chronic rotenone-induced oxidative stress in transfected neuron primary cultures was performed at day 6 (DIV6) by replaced  $\frac{1}{2}$  media with rotenone (50 nM) (Sigma). 24h or 48h after rotenone treatment, viability of plated cortical cells was estimated using the Trypan blue exclusion essay (Sigma). siCtrl or siOPA1 transfected neurons, with or without rotenone treatment, were then incubated in the presence of 0.2 % Trypan blue in PBS 1X for 3 min. Viable cells (blue negatives) and dead cells (blue positives) were estimated by counting under light microscope.

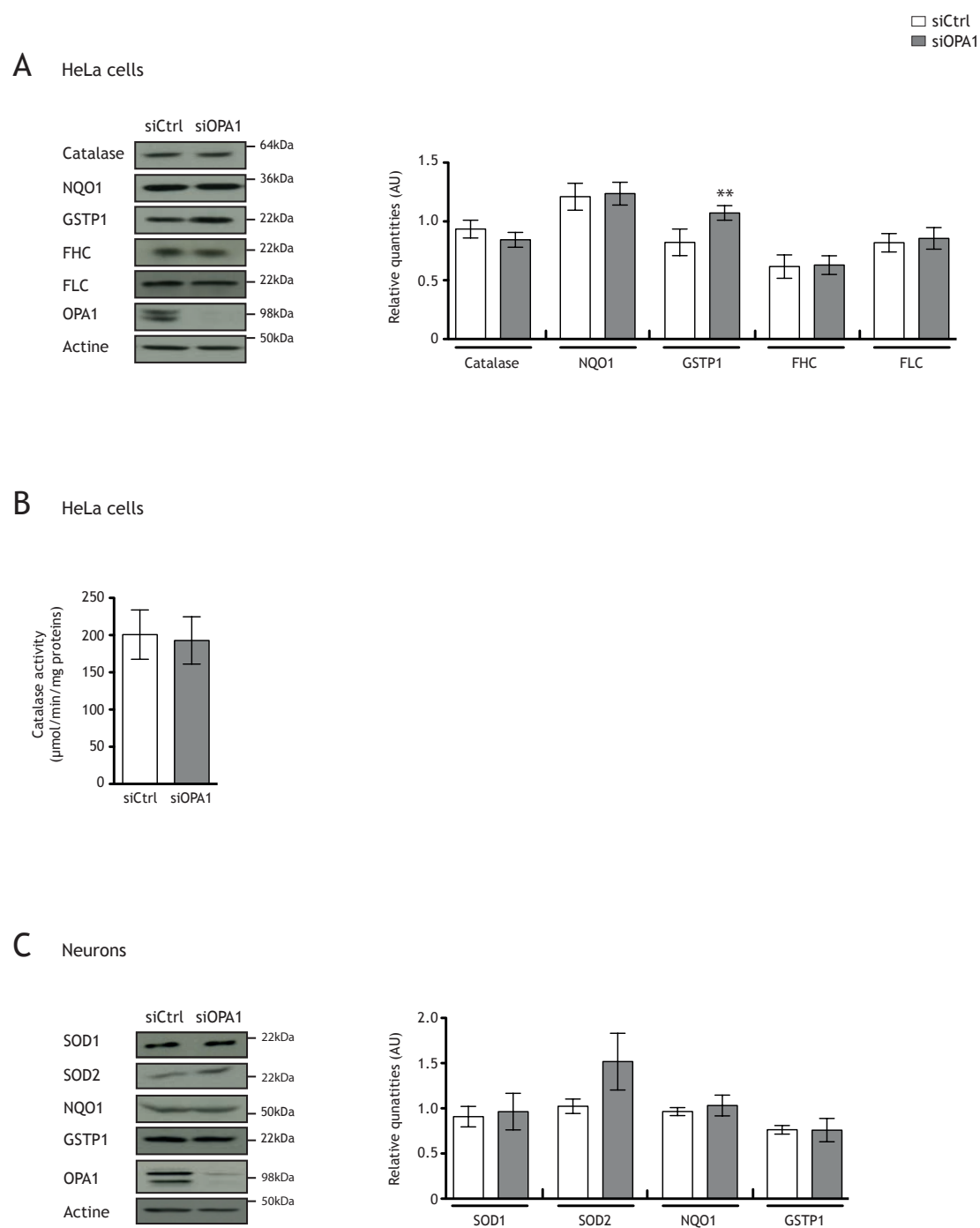
Millet *et al.* Supplemental Figure 1**A** HeLa cells**B** Neurons

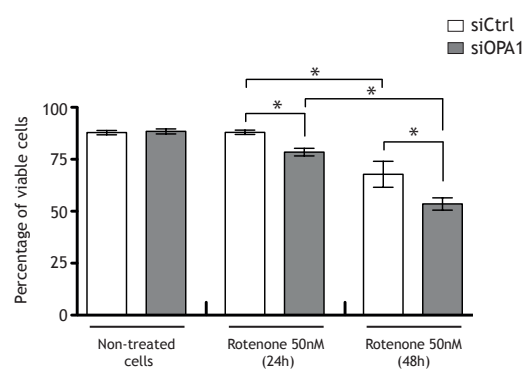
Millet *et al.* Supplemental Figure 2

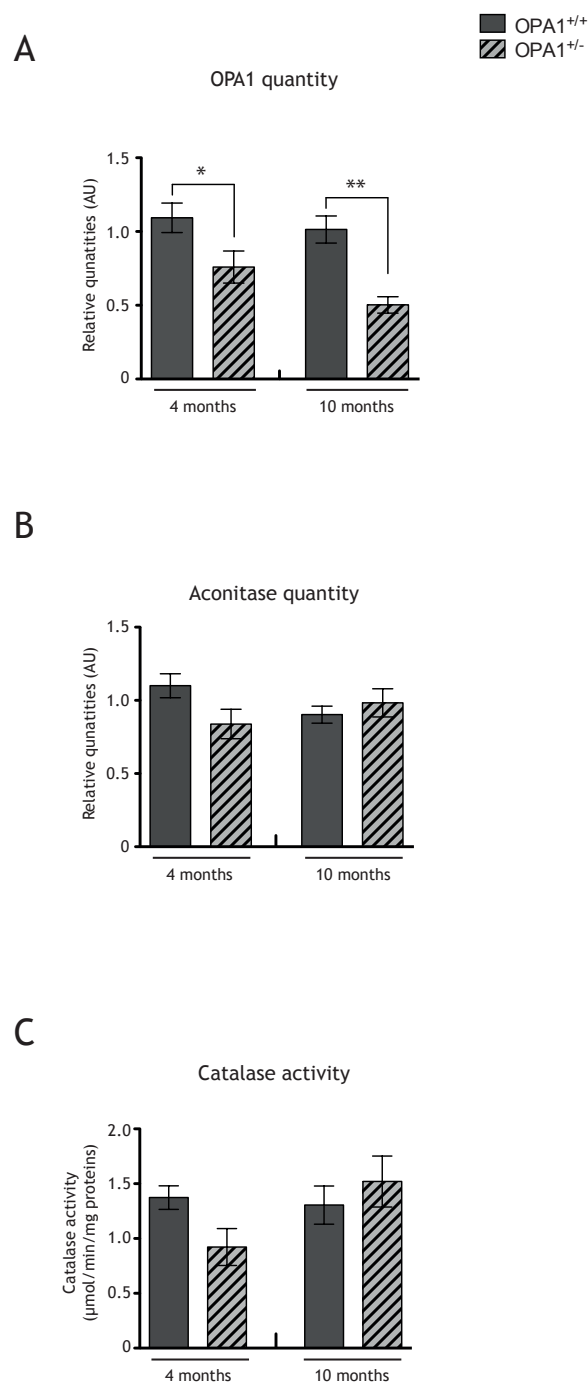


Millet *et al.* Supplemental Figure 3**A** HeLa cells**B** Neurons

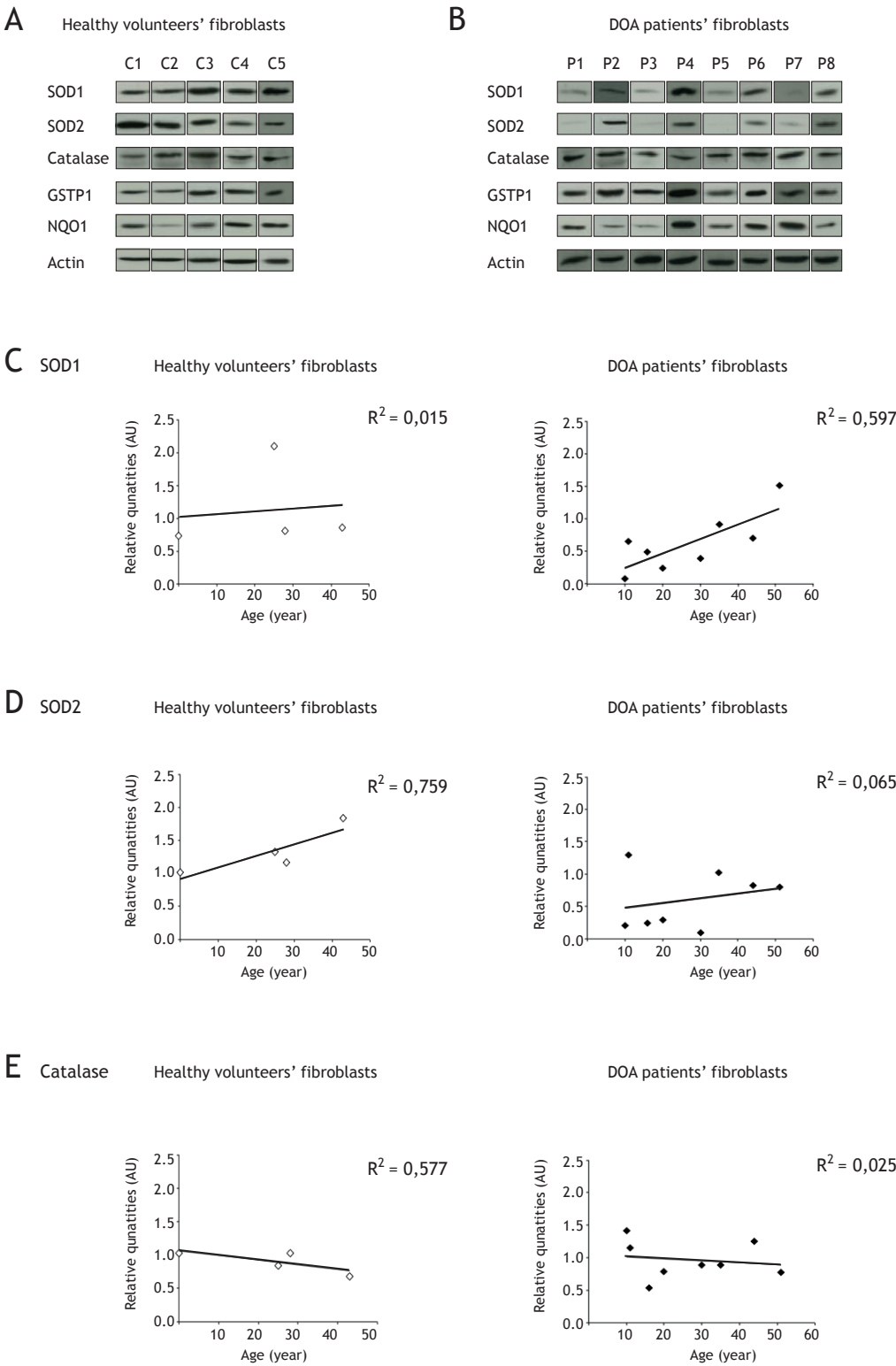
Millet *et al.* Supplemental Figure 4

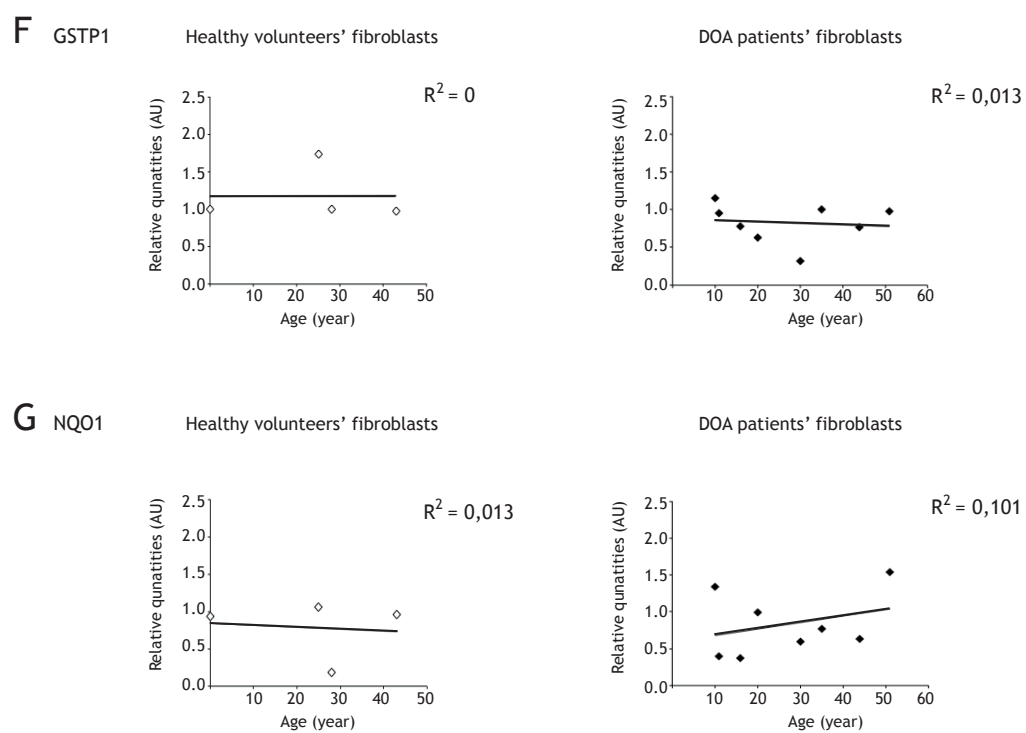
Millet *et al.* Supplemental Figure 5

Millet *et al.* Supplemental Figure 6

Millet *et al.* Supplemental Figure 7

Millet *et al.* Supplemental Figure 8



Millet *et al.* Supplemental Figure 8

## Supplemental Figures legends

### Supplemental Figure 1 – Mitochondrial biomass is not affected by the loss of OPA1 both in HeLa cells and neurons

Representative immunoblots and histograms showing protein levels of OPA1 (inner membrane), HSP60 (matrix), citrate synthase (matrix), VDAC (outer membrane) and TOM20 (outer membrane) relative to actin in OPA1 down-regulated **(A)** HeLa cells (n=5-8) and **(B)** neurons (n=5). OPA1 proteins levels are drastically in siOPA1-transfected HeLa cells (92%) and in neurons (70%). In OPA1 down-regulated HeLa cells and neurons, there are no differences of all proteins quantities compared to control cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=5-8. P values were determined by Student's-paired t-test **(A, B)**,  $p < 0.001^{***}$ .

### Supplemental Figure 2 – Down regulation of OPA1 doesn't globally change the tricarboxylic acid (TCA) cycle activity and intracellular ATP level

**(A)** Total intracellular ATP level was unchanged in OPA1 down-regulated cells when compared to siCtrl-treated cells. **(B)** Ratio of  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  and total intracellular levels of  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  were unchanged in HeLa cells transfected with siOPA1 when compared to siCtrl cells. **(C)** Activities of TCA cycle enzymes citrate synthase, succinate dehydrogenase, fumarase and malate dehydrogenase, in siOPA1-treated HeLa cells and in control cells. Both succinate dehydrogenase and fumarase activities were slightly decreased in siOPA1-treated HeLa cells ( $6.438 \pm 0.701$  and  $90.56 \pm 6.34$  respectively) compared to control cells transfected with siCtrl ( $8.688 \pm 0.7229$  and  $107.3 \pm 9.423$  respectively). **(D)** Extracellular lactate levels were the same in HeLa cells with or without siOPA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=4-5 (A), n=5 (B), n=16 (C) and n=2 (D). P values were determined by Student's-paired t-test  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.001^{***}$ .



**Supplemental Figure 3 – Aconitase quantity in OPA1-depleted cells**

Representative immunoblots and histograms showing that OPA1 down-regulation in **(A)** HeLa cells and **(B)** neurons has no effect on the expression of aconitase relative to actin. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=8 (A), n=6 (B). Statistical analysis was determined by Student's-paired t-test.

**Supplemental Figure 4 – Kinetic of NRF2 nuclear translocation in HeLa cells upon OPA1 down-regulation**

Representative histogram showing percentage of cells with NRF2 nuclear translocation 66h, 67h, 68h, 69h, 70h and 72h after siOPA1 (grey) and siCtrl (white) transfection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=4-14 (400 cells per condition). Statistical analysis was determined by Student's-paired t-test  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

**Supplemental Figure 5 – NRF2 target proteins levels in siOPA1 treated neurons and HeLa cells**

**(A)** Representative immunoblots and histograms showing the effect of OPA1 down-regulation on catalase, NAD(P)H deshydrogenase quinone 1 (NQO1), glutathione-s-transferase p1 (GSTP1), Ferritin Heavy Chain (FHC) and Ferritin Light Chain (FLC) expressions relative to actin, in siOPA1 or siCtrl-treated HeLa cells. Only GSTP1 was increased about 30 % in siOPA1-treated HeLa cells. **(B)** Catalase activity is unchanged in HeLa cells transfected with siOPA1 when compared to siCtrl. **(C)** Representative immunoblots of SOD1, SOD2, NQO1 and GSTP1 expressions relative to actin, in siOPA1 and siCtrl-treated neurons. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=8 (A), n=5 (B), n=7 (C). Statistical significance was determined by Student's-paired t-test  $p < 0.01^{**}$ .

**Supplemental Figure 6 – Chronic oxidative stress by rotenone treatment impairs neurons viability**

Trypan blue assays were performed 24h and 48h after 50nM rotenone exposure in neurons transfected with or without siOPA1, to induce chronic oxidative stress. Both in 24h and 48h rotenone treatment, the number of viable cells are lower in siOPA1-transfected neurons, respectively of 9.5 and 14.3 % when compared to siCtrl cells. A chronic oxidative stress induced a 20.2 % decreased of viability in siCtrl neurons between 24h and 48h rotenone treatment, and a 25.0 % in siOPA1-treated neurons between 24h and 48h rotenone treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM with n=4. Statistical significance was determined by Student's-paired t-test  $p < 0.05^*$  for siCtrl versus siOPA1 per condition, and by a nonparametric test (Mann-Whitney test) for siCtrl and siOPA1 (24h rotenone treatment) *versus* siCtrl and siOPA1 (48h rotenone treatment) respectively,  $p < 0.05^*$ .

**Supplemental Figure 7 – OPA1 and aconitase quantities, and catalase activities in *OPA1*<sup>+/-</sup> transgenic mice**

**(A)** Histograms representative of OPA1 quantities in cortices of 4 (n=10) and 10 (n=6) months old control mice (grey) and DOA mice model (striped). OPA1 quantity is significantly decreased in *OPA1*<sup>+/-</sup> 4 months old mice (0.76  $\pm$  0.11) compared to 4 months old *OPA1*<sup>+/+</sup> mice (1.09  $\pm$  0.10), as well as in 10 months old *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (0.50  $\pm$  0.06) compared to 10 months old control *OPA1*<sup>+/+</sup> mice (1.01  $\pm$  0.09). **(B)** Histogram representative of aconitase quantities in cortices of 4 (n=10) and 10 (n=6) months old control mice (grey) and DOA mice model (striped). **(C)** Catalase activities were measured in cortices of control and mutant mice at 4 (n=10) and 10 (n=6) months old.

**Supplemental Figure 8 – DOA patient's fibroblasts and control's fibroblasts antioxidant proteins levels**

Representative immunoblot showing levels of SOD1, SOD2, catalase, GSTP1, NQO1 and actin **(A)** in five healthy volunteer's (CTRL) fibroblasts (C1-C5) and **(B)** in eight DOA patient's fibroblasts (P1-P8).

**(C)** Antioxidant proteins levels relative to the age of patients and controls' fibroblasts: the quantity of each protein is not correlated to the age of the persons.

# Bibliographie

# BIBLIOGRAPHIE

- Abramov, Andrey Yurevich, Matthew Gegg, Anne Grunewald, Nicholas William Wood, Christine Klein, and Anthony Henry Vernon Schapira. 2011. "Bioenergetic Consequences of PINK1 Mutations in Parkinson Disease." *PloS one* 6(10): e25622.
- Abu-Amero, Khaled K, Mohammad Jaber, Ali Hellani, and Thomas M Bosley. 2010. "Genome-Wide Expression Profile of LHON Patients with the 11778 Mutation." *The British journal of ophthalmology* 94(2): 256–59.
- Acín-Pérez, Rebeca, María Pilar Bayona-Bafaluy, Patricio Fernández-Silva, Raquel Moreno-Loshuertos, Acisclo Pérez-Martos, Claudio Bruno, Carlos T Moraes, and José A Enríquez. 2004. "Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria." *Molecular cell* 13(6): 805–15.
- Acin-Perez, Rebeca, and Jose a Enríquez. 2013. "The Function of the Respiratory Supercomplexes: The Plasticity Model." *Biochimica et biophysica acta* 1837(4): 444–50.
- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular cell* 32(4): 529–39.
- Adams, Suzanne M, Juan Carlos de Rivero Vaccari, and Roderick A Corriveau. 2004. "Pronounced Cell Death in the Absence of NMDA Receptors in the Developing Somatosensory Thalamus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(42): 9441–50.
- Agier, Virginie, Patricia Oliviero, Jeanne Lainé, Caroline L'Hermitte-Stead, Samantha Girard, Sandrine Fillaut, Claude Jardel, Frédéric Bouillaud, Anne Laure Bulteau, and Anne Lombès. 2012. "Defective Mitochondrial Fusion, Altered Respiratory Function, and Distorted Cristae Structure in Skin Fibroblasts with Heterozygous OPA1 Mutations." *Biochimica et biophysica acta* 1822(10): 1570–80.
- Akepati, Vasudheva Reddy, Eva-Christina Müller, Albrecht Otto, Holger M Strauss, Michael Portwich, and Christiane Alexander. 2008. "Characterization of OPA1 Isoforms Isolated from Mouse Tissues." *Journal of neurochemistry* 106(1): 372–83.
- Alam, Z I, A Jenner, S E Daniel, A J Lees, N Cairns, C D Marsden, P Jenner, and B Halliwell. 1997. "Oxidative DNA Damage in the Parkinsonian Brain: An Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra." *Journal of neurochemistry* 69(3): 1196–1203.
- Alavi, Marcel V, Stefanie Bette, Simone Schimpf, Frank Schuettauf, Ulrich Schraermeyer, Hans F Wehrl, Lukas Ruttiger, Susanne C Beck, Felix Tonagel, Bernd J Pichler, Marlies Knipper, Thomas Peters, Juergen Laufs, and Bernd Wissinger. 2007. "A Splice Site Mutation in the Murine Opa1 Gene Features Pathology of Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Brain : a journal of neurology* 130(Pt 4): 1029–42.
- Alavi, Marcel V, Nico Fuhrmann, Huu Phuc Nguyen, Patrick Yu-Wai-Man, Peter Heiduschka, Patrick F Chinnery, and Bernd Wissinger. 2009. "Subtle Neurological and Metabolic Abnormalities in an Opa1 Mouse Model of Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Experimental neurology* 220(2): 404–9.
- Alexander, C, M Votruba, U E Pesch, D L Thiselton, S Mayer, A Moore, M Rodriguez, U Kellner, B Leo-Kottler, G Auburger, S S Bhattacharya, and B Wissinger. 2000. "OPA1, Encoding a Dynamin-Related GTPase, Is Mutated in Autosomal Dominant Optic Atrophy Linked to Chromosome 3q28 [In Process Citation]." *Nat Genet* 26(2): 211–15.
- Allen, K L, A Almeida, T E Bates, and J B Clark. 1995. "Changes of Respiratory Chain Activity in Mitochondrial and Synaptosomal Fractions Isolated from the Gerbil Brain after Graded Ischaemia." *Journal of neurochemistry* 64(5): 2222–29.
- Amati-Bonneau, P, M L Valentino, P Reynier, M E Gallardo, B Bornstein, A Boissiere, Y Campos, H Rivera, J G de la Aleja, R Carroccia, L Iommarini, P Labauge, D Figarella-Branger, P Marcotelles, A Furby, K Beauvais, F Letournel, R Liguori, C La Morgia, P Montagna, M Liguori, C Zanna, M Rugolo, A Cossarizza, B Wissinger, C Verny, R Schwarzenbacher, M A Martin, J Arenas, C Ayuso, R Garesse, G Lenaers, D Bonneau, and V Carelli. 2008. "OPA1 Mutations Induce Mitochondrial DNA Instability and Optic Atrophy 'plus' Phenotypes." *Brain* 131(Pt 2): 338–51.
- Amati-Bonneau, Patrizia, Dan Milea, Dominique Bonneau, Arnaud Chevrollier, Marc Ferré, Virginie Guillet, Naïg Gueguen, Dominique Loiseau, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Vincent Procaccio, Guy Lenaers, and Pascal Reynier. 2009. "OPA1-Associated Disorders: Phenotypes and Pathophysiology." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10): 1855–65.

- An, Hyun-Jung, Geunyoung Cho, Jie-Oh Lee, Sang-Gi Paik, Young Sang Kim, and Hayyoung Lee. 2013. "Higd-1a Interacts with Opa1 and Is Required for the Morphological and Functional Integrity of Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(32): 13014–19.
- Anand, Ruchika, Timothy Wai, Michael J. Baker, Nikolay Kladt, Astrid C. Schauss, Elena Rugarli, and Thomas Langer. 2014. "The I-AAA Protease YME1L and OMA1 Cleave OPA1 to Balance Mitochondrial Fusion and Fission." *The Journal of Cell Biology* 204(6): 919–29.
- Anderson, John F, Efrain Siller, and Jose M Barral. 2010. "The Sacsin Repeating Region (SRR): A Novel Hsp90-Related Supra-Domain Associated with Neurodegeneration." *Journal of molecular biology* 400(4): 665–74.
- Anekonda, Thimmappa S, and P Hemachandra Reddy. 2006. "Neuronal Protection by Sirtuins in Alzheimer's Disease." *Journal of neurochemistry* 96(2): 305–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219030> (May 25, 2014).
- Antignani, Antonella, and Richard J Youle. 2007. "The Cytokine, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Can Deliver Bcl-XL as an Extracellular Fusion Protein to Protect Cells from Apoptosis and Retain Differentiation Induction." *The Journal of biological chemistry* 282(15): 11246–54.
- Arakaki, Naokatu, Takeshi Nishihama, Hiroyuki Owaki, Yoshinori Kuramoto, Midori Suenaga, Eri Miyoshi, Yuka Emoto, Hirofumi Shibata, Masayuki Shono, and Tomihiko Higuti. 2006. "Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle." *Biological & pharmaceutical bulletin* 29(9): 1962–65.
- Archibald, Neil K, Michael P Clarke, Urs P Mosimann, and David J Burn. 2009. "The Retina in Parkinson's Disease." *Brain : a journal of neurology* 132(Pt 5): 1128–45.
- Ardehali, Hossein, Zhenhui Chen, Young Ko, Rafael Mejía-Alvarez, and Eduardo Marbán. 2004. "Multiprotein Complex Containing Succinate Dehydrogenase Confers Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(32): 11880–85.
- Arnold, I, K Pfeiffer, W Neupert, R A Stuart, and H Schagger. 1998. "Yeast Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits." *The EMBO journal* 17(24): 7170–78.
- Arnoult, Damien. 2010. "Dynamique Mitochondriale : Des Mitochondries." 783–86.
- Arnoult, Damien, Alain Grodet, Yang-Ja Lee, Jérôme Estaquier, and Craig Blackstone. 2005. "Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation." *The Journal of biological chemistry* 280(42): 35742–50.
- Ashor, Ammar W, Jose Lara, John C Mathers, and Mario Siervo. 2014. "Effect of Vitamin C on Endothelial Function in Health and Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials." *Atherosclerosis* 235(1): 9–20.
- Baker, Michael J, Philipp A Lampe, Diana Stojanovski, Anne Korwitz, Ruchika Anand, Takashi Tatsuta, and Thomas Langer. 2014. "Turnover Regulate OPA1-Dependent Mitochondrial Dynamics." 1–16.
- Bansal, Neelam, and Shamsheer S Kanwar. 2013. "Peroxidase(s) in Environment Protection." *TheScientificWorldJournal* 2013: 714639.
- Baradaran, Rozbeh, John M Berrisford, Gurdeep S Minhas, and Leonid A Sazanov. 2013. "Crystal Structure of the Entire Respiratory Complex I." *Nature* 494(7438): 443–48.
- Barboni, Piero, Maria Lucia Valentino, Chiara La Morgia, Michele Carbonelli, Giacomo Savini, Annamaria De Negri, Francesca Simonelli, Federico Sadun, Leonardo Caporali, Alessandra Maresca, Rocco Liguori, Agostino Baruzzi, Massimo Zeviani, and Valerio Carelli. 2013. "Idebenone Treatment in Patients with OPA1-Mutant Dominant Optic Atrophy." *Brain : a journal of neurology* 136(Pt 2): e231.
- Barros, Fabrício F T, Tarek M A Abdel-Fatah, Paul Moseley, Christopher C Nolan, Alice C Durham, Emad A Rakha, Stephen Chan, Ian O Ellis, and Andrew R Green. 2014. "Characterisation of HER Heterodimers in Breast Cancer Using in Situ Proximity Ligation Assay." *Breast cancer research and treatment* 144(2): 273–85.
- Belousov, Vsevolod V, Arkady F Fradkov, Konstantin A Lukyanov, Dmitry B Staroverov, Konstantin S Shakhbazov, Alexey V Tersikh, and Sergey Lukyanov. 2006. "Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide." *Nature methods* 3(4): 281–86.
- Ben-Porath, Ittai, and Robert A Weinberg. 2005. "The Signals and Pathways Activating Cellular Senescence." *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(5): 961–76.
- Bereiter-Hahn, Jürgen, and Marina Jendrach. 2010. "Mitochondrial Dynamics." *International review of cell and molecular biology* 284(10): 1–65.
- Berger, K H, and M P Yaffe. 1996. "Mitochondrial Distribution and Inheritance." *Experientia* 52(12): 1111–16.

- Bertholet, Ambre M, Aurélie M E Millet, Oriane Guillermin, Marlène Daloyau, Noémie Davezac, Marie-Christine Miquel, and Pascale Belenguer. 2013. "OPA1 Loss of Function Affects in Vitro Neuronal Maturation." *Brain : a journal of neurology* 136(Pt 5): 1518–33.
- Bianchi, Cristina, Maria Luisa Genova, Giovanna Parenti Castelli, and Giorgio Lenaz. 2004. "The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly: Kinetic Evidence Using Flux Control Analysis." *The Journal of biological chemistry* 279(35): 36562–69.
- Billen, L P, A Shamas-Din, and D W Andrews. 2008. "Bid: A Bax-like BH3 Protein." *Oncogene* 27 Suppl 1: S93–104.
- Bischof, Oliver, Anne Dejean, and Pascal Pineau. 2009. "[A Review of Cellular Senescence: Friend or Foe of Tumorigenesis?]." *Médecine sciences : M/S* 25(2): 153–60.
- Bisetto, Elena, Paola Picotti, Valentina Giorgio, Vera Alverdi, Irene Mavelli, and Giovanna Lippe. 2008. "Functional and Stoichiometric Analysis of Subunit E in Bovine Heart Mitochondrial F(0)F(1)ATP Synthase." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40(4): 257–67.
- Bloom, David A, and Anil K Jaiswal. 2003. "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element." *The Journal of biological chemistry* 278(45): 44675–82.
- Boesch, Pierre, Noha Ibrahim, André Dietrich, and Robert N Lightowlers. 2010. "Membrane Association of Mitochondrial DNA Facilitates Base Excision Repair in Mammalian Mitochondria." *Nucleic acids research* 38(5): 1478–88.
- Bohnert, Maria, Lena-Sophie Wenz, Ralf M Zerbes, Susanne E Horvath, David a Stroud, Karina von der Malsburg, Judith M Müller, Silke Oeljeklaus, Inge Perschil, Bettina Warscheid, Agnieszka Chacinska, Marten Veenhuis, Ida J van der Klei, Günther Daum, Nils Wiedemann, Thomas Becker, Nikolaus Pfanner, and Martin van der Laan. 2012. "Role of Mitochondrial Inner Membrane Organizing System in Protein Biogenesis of the Mitochondrial Outer Membrane." *Molecular biology of the cell* 23(20): 3948–56.
- Bolender, Natalia, Albert Sickmann, Richard Wagner, Chris Meisinger, and Nikolaus Pfanner. 2008. "Multiple Pathways for Sorting Mitochondrial Precursor Proteins." *EMBO reports* 9(1): 42–49.
- Bolhassani, Azam, Afshin Khavari, and S Zahra Bathaie. 2014. "Saffron and Natural Carotenoids: Biochemical Activities and Anti-Tumor Effects." *Biochimica et biophysica acta* 1845(1): 20–30.
- Bossy-Wetzel, Ella, Mark J Barsoum, Adam Godzik, Robert Schwarzenbacher, and Stuart A Lipton. 2003. "Mitochondrial Fission in Apoptosis, Neurodegeneration and Aging." *Current Opinion in Cell Biology* 15(6): 706–16.
- Boumans, H, L A Grivell, and J A Berden. 1998. "The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit." *The Journal of biological chemistry* 273(9): 4872–77.
- Brandmeyer, Emily A, Qiuhua Shen, Amanda R Thimmesch, and Janet D Pierce. 2014. "Using Coenzyme Q10 in Clinical Practice." *Nursing* 44(3): 63–66.
- Braschi, Emélie, Rodolfo Zunino, and Heidi M McBride. 2009. "MAPL Is a New Mitochondrial SUMO E3 Ligase That Regulates Mitochondrial Fission." *EMBO reports* 10(7): 748–54.
- Breckenridge, David G, Marc Germain, Jaigi P Mathai, Mai Nguyen, and Gordon C Shore. 2003. "Regulation of Apoptosis by Endoplasmic Reticulum Pathways." *Oncogene* 22(53): 8608–18.
- Brennan, Angela M, Sang Won Suh, Seok Joon Won, Purnima Narasimhan, Tiina M Kauppinen, Hokyou Lee, Ylva Edling, Pak H Chan, and Raymond A Swanson. 2009. "NADPH Oxidase Is the Primary Source of Superoxide Induced by NMDA Receptor Activation." *Nature neuroscience* 12(7): 857–63.
- De Brito, Olga Martins, and Luca Scorrano. 2008. "Mitofusin 2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria." *Nature* 456(7222): 605–10.
- Brookes, Paul S, Yisang Yoon, James L Robotham, M W Anders, and Shey-Shing Sheu. 2004. "Calcium, ATP, and ROS: A Mitochondrial Love-Hate Triangle." *American journal of physiology. Cell physiology* 287(4): C817–33.
- Brown, C R, L Q Hong-Brown, and W J Welsh. 1997. "Correcting Temperature-Sensitive Protein Folding Defects." *J Clin Invest* 99(6): 1432–44.
- Brown, J P, W Wei, and J M Sedivy. 1997. "Bypass of Senescence after Disruption of p21Cip1/Waf1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts." *Science* 277: 834–37.
- Bruel, C, R Brasseur, and B L Trumpower. 1996. "Subunit 8 of the Saccharomyces Cerevisiae Cytochrome bc1 Complex Interacts with Succinate-Ubiquinone Reductase Complex." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 28(1): 59–68.
- BRUYN, G W, and L N WENT. "A SEX-LINKED HEREDO-DEGENERATIVE NEUROLOGICAL DISORDER, ASSOCIATED WITH LEBER'S OPTIC ATROPHY. I. CLINICAL STUDIES." *Journal of the neurological sciences* 1(1): 59–80.

- Burnham-Marusich, Amanda R, and Patricia M Berninsone. 2012. "Multiple Proteins with Essential Mitochondrial Functions Have Glycosylated Isoforms." *Mitochondrion* 12(4): 423–27.
- Calderon, P B, and M Roberfroid. "[Free Radicals and Free Radical-Mediated Toxicity]." *Journal de pharmacie de Belgique* 43(5): 390–400.
- Calvo, Sarah, Mohit Jain, Xiaohui Xie, Sunil A Sheth, Betty Chang, Olga A Goldberger, Antonella Spinazzola, Massimo Zeviani, Steven A Carr, and Vamsi K Mootha. 2006. "Systematic Identification of Human Mitochondrial Disease Genes through Integrative Genomics." *Nature genetics* 38(5): 576–82.
- Cantu-Medellin, Nadiezhda, and Eric E Kelley. 2013. "Xanthine Oxidoreductase-Catalyzed Reactive Species Generation: A Process in Critical Need of Reevaluation." *Redox biology* 1(1): 353–58.
- Carelli, V, P Barboni, A Zacchini, R Mancini, L Monari, S Cevoli, R Liguori, M Sensi, E Lugaesi, and P Montagna. 1998. "Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) with 14484/ND6 Mutation in a North African Patient." *Journal of the neurological sciences* 160(2): 183–88.
- Carelli, V, M Rugolo, G Sgarbi, A Ghelli, C Zanna, A Baracca, G Lenaz, E Napoli, A Martinuzzi, and G Solaini. 2004. "Bioenergetics Shapes Cellular Death Pathways in Leber's Hereditary Optic Neuropathy: A Model of Mitochondrial Neurodegeneration." *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2): 172–79.
- Carelli, Valerio, Fred N Ross-Cisneros, and Alfredo A Sadun. 2004. "Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Optic Neuropathies." *Progress in retinal and eye research* 23(1): 53–89.
- Carlucci, Annalisa, Luca Lignitto, and Antonio Feliciello. 2008. "Control of Mitochondria Dynamics and Oxidative Metabolism by cAMP, AKAPs and the Proteasome." *Trends in cell biology* 18(12): 604–13.
- Cartoni, Romain, Bertrand Léger, M Benjamin Hock, Manu Praz, Antoinette Crettenand, Sara Pich, Jean-Luc Ziltener, François Luthi, Olivier Dériaz, Antonio Zorzano, Charles Gobelet, Anastasia Kralli, and Aaron P Russell. 2005. "Mitofusins 1/2 and ERRalpha Expression Are Increased in Human Skeletal Muscle after Physical Exercise." *The Journal of physiology* 567(Pt 1): 349–58.
- Cartoni, Romain, and Jean-Claude Martinou. 2009. "Role of Mitofusin 2 Mutations in the Physiopathology of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A." *Experimental neurology* 218(2): 268–73.
- Carvalho, Andreia N, Jamie L Lim, Philip G Nijland, Maarten E Witte, and Jack Van Horsen. 2014. "Glutathione in Multiple Sclerosis: More than Just an Antioxidant?" *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*.
- Casari, G, M De Fusco, S Ciarmatori, M Zeviani, M Mora, P Fernandez, G De Michele, A Filla, S Coccoza, R Marconi, A Dürr, B Fontaine, and A Ballabio. 1998. "Spastic Paraplegia and OXPHOS Impairment Caused by Mutations in Paraplegin, a Nuclear-Encoded Mitochondrial Metalloprotease." *Cell* 93(6): 973–83.
- Cassereau, Julien, Arnaud Chevrollier, Naïg Gueguen, Marie-Claire Malinge, Franck Letournel, Guillaume Nicolas, Laurence Richard, Marc Ferre, Christophe Verny, Frédéric Dubas, Vincent Procaccio, Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Bonneau, and Pascal Reynier. 2009. "Mitochondrial Complex I Deficiency in GDAP1-Related Autosomal Dominant Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT2K)." *Neurogenetics* 10(2): 145–50.
- Cereghetti, G M, A Stangherlin, O Martins de Brito, C R Chang, C Blackstone, P Bernardi, and L Scorrano. 2008. "Dephosphorylation by Calcineurin Regulates Translocation of Drp1 to Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(41): 15803–8.
- Chaban, Yuriy, Egbert J Boekema, and Natalya V Dudkina. 2014. "Structures of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Supercomplexes and Mechanisms for Their Stabilisation." *Biochimica et biophysica acta* 1837(4): 418–26.
- Chacinska, Agnieszka, Carla M Koehler, Dusanka Milenkovic, Trevor Lithgow, and Nikolaus Pfanner. 2009. "Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms." *Cell* 138(4): 628–44.
- Chan, David C. 2012. "Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health." *Annual review of genetics* 46: 265–87.
- Chan, Nickie C, and David C Chan. 2011. "Parkin Uses the UPS to Ship off Dysfunctional Mitochondria." *Autophagy* 7(7): 771–72.
- Chang, Chuang-Rung, and Craig Blackstone. 2010. "Dynamic Regulation of Mitochondrial Fission through Modification of the Dynamin-Related Protein Drp1." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201: 34–39.
- Chang, D.T.W., and I.J. Reynolds. 2006. "Differences in Mitochondrial Movement and Morphology in Young and Mature Primary Cortical Neurons in Culture." *Neuroscience* 141(2): 727–36.
- Chen, Hsiuchen, and David C Chan. 2005. "Emerging Functions of Mammalian Mitochondrial Fusion and Fission." *Human molecular genetics* 14 Spec No(suppl 2): R283–9.
- . 2010. "Physiological Functions of Mitochondrial Fusion." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201: 21–25.



- Chen, Hsiuchen, Anne Chomyn, and David C Chan. 2005a. "Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction." *The Journal of biological chemistry* 280(28): 26185–92.
- Chen, Hsiuchen, Scott A Detmer, Andrew J Ewald, Erik E Griffin, Scott E Fraser, and David C Chan. 2003. "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development." *The Journal of cell biology* 160(2): 189–200.
- Chen, Hsiuchen, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2007. "Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum." *Cell* 130(3): 548–62.
- Chen, Hsiuchen, Marc Vermulst, Yun E Wang, Anne Chomyn, Tomas A Prolla, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2010. "Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations." *Cell* 141(2): 280–89.
- Chen, Xin Jie, Xiaowen Wang, and Ronald A Butow. 2007. "Yeast Aconitase Binds and Provides Metabolically Coupled Protection to Mitochondrial DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(34): 13738–43.
- Chen, Xin Jie, Xiaowen Wang, Brett A Kaufman, and Ronald A Butow. 2005. "Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance." *Science (New York, N.Y.)* 307(5710): 714–17.
- Cheng, Xin, and Andreas S Ivessa. 2010. "Association of the Yeast DNA Helicase Pif1p with Mitochondrial Membranes and Mitochondrial DNA." *European journal of cell biology* 89(10): 742–47.
- Chevrollier, Arnaud, Virginie Guillet, Dominique Loiseau, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Marc Ferre, Hélène Dollfus, Sylvie Odent, Dan Milea, Cyril Goizet, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, and Pascal Reynier. 2008. "Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect." *Annals of neurology* 63(6): 794–98.
- Chinta, Shankar J, and Julie K Andersen. 2011. "Nitrosylation and Nitration of Mitochondrial Complex I in Parkinson's Disease." *Free radical research* 45(1): 53–58.
- Cho, Bongki, So Yoen Choi, Hyo Min Cho, Hyun Jung Kim, and Woong Sun. 2013. "Physiological and Pathological Significance of Dynamin-Related Protein 1 (Drp1)-Dependent Mitochondrial Fission in the Nervous System." *Experimental neurobiology* 22(3): 149–57.
- Cho, Dong-Hyung, Tomohiro Nakamura, Jianguo Fang, Piotr Cieplak, Adam Godzik, Zelong Gu, and Stuart A Lipton. 2009. "S-Nitrosylation of Drp1 Mediates Beta-Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury." *Science (New York, N.Y.)* 324(5923): 102–5.
- Choi, Seok-Yong, Ping Huang, Gary M Jenkins, David C Chan, Juergen Schiller, and Michael A Frohman. 2006. "A Common Lipid Links Mfn-Mediated Mitochondrial Fusion and SNARE-Regulated Exocytosis." *Nature cell biology* 8(11): 1255–62.
- Choksi, K B, W H Boylston, J P Rabek, W R Widger, and J Papaconstantinou. 2004. "Oxidatively Damaged Proteins of Heart Mitochondrial Electron Transport Complexes." *Biochimica et biophysica acta* 1688(2): 95–101.
- Chu, Charleen T, Jing Ji, Ruben K Dagda, Jian Fei Jiang, Yulia Y Tyurina, Alexandr a Kapralov, Vladimir A Tyurin, Naveena Yanamala, Indira H Shrivastava, Dariush Mohammadyani, Kent Zhi Qiang Wang, Jianhui Zhu, Judith Klein-Seetharaman, Krishnakumar Balasubramanian, Andrew a Amoscato, Grigory Borisenko, Zhentai Huang, Aaron M Gusdon, Amin Cheikhi, Erin K Steer, Ruth Wang, Catherine Baty, Simon Watkins, Ivet Bahar, Hülya Bayır, Valerian E Kagan, Kent Zhi, and Qiang Wang. 2013. "Cardiolipin Externalization to the Outer Mitochondrial Membrane Acts as an Elimination Signal for Mitophagy in Neuronal Cells." *Nature cell biology* 15(10): 1197–1205.
- Chung, Jacky, Caiyong Chen, and Barry H Paw. 2012. "Heme Metabolism and Erythropoiesis." *Current opinion in hematology* 19(3): 156–62.
- Chung, Young Min, Jun Suk Kim, and Young Do Yoo. 2006. "A Novel Protein, Romo1, Induces ROS Production in the Mitochondria." *Biochemical and biophysical research communications* 347(3): 649–55.
- Cipolat, Sara, Olga Martins de Brito, Barbara Dal Zilio, and Luca Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45): 15927–32.
- Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, Veronica Costa, Alberto Casarin, Ligia C Gomes, Ester Perales-Clemente, Leonardo Salvati, Patricio Fernandez-Silva, Jose a Enriquez, and Luca Scorrano. 2013. "Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency." *Cell* 155(1): 160–71.

- Cohn, Amy C, Carmel Toomes, Catherine Potter, Katherine V Towns, Alex W Hewitt, Chris F Inglehearn, Jamie E Craig, and David A Mackey. 2007. "Autosomal Dominant Optic Atrophy: Penetrance and Expressivity in Patients with OPA1 Mutations." *American journal of ophthalmology* 143(4): 656–62.
- Collins, Tony J, Michael J Berridge, Peter Lipp, and Martin D Bootman. 2002. "Mitochondria Are Morphologically and Functionally Heterogeneous within Cells." *The EMBO journal* 21(7): 1616–27.
- Conrad, Marcus, Joel Schick, and Jose Pedro Friedmann Angeli. 2013. "Glutathione and Thioredoxin Dependent Systems in Neurodegenerative Disease: What Can Be Learned from Reverse Genetics in Mice." *Neurochemistry international* 62(5): 738–49.
- Cooper, C E, and N A Davies. 2000. "Effects of Nitric Oxide and Peroxynitrite on the Cytochrome Oxidase K(m) for Oxygen: Implications for Mitochondrial Pathology." *Biochimica et biophysica acta* 1459(2-3): 390–96.
- Cosentino, Katia, and Ana J García-Sáez. 2014. "Mitochondrial Alterations in Apoptosis." *Chemistry and physics of lipids* 181C: 62–75.
- Cribbs, J Thomas, and Stefan Strack. 2007. "Reversible Phosphorylation of Drp1 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Cell Death." *EMBO reports* 8(10): 939–44.
- Cruciat, C M, S Brunner, F Baumann, W Neupert, and R A Stuart. 2000. "The Cytochrome bc1 and Cytochrome c Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 275(24): 18093–98.
- Da Cruz, Sandrine, Philippe A Parone, Philippe Gonzalo, Willy V Bienvenut, Daniel Tondera, Alexis Jourdain, Manfredo Quadroni, and Jean-Claude Martinou. 2008. "SLP-2 Interacts with Prohibitins in the Mitochondrial Inner Membrane and Contributes to Their Stability." *Biochimica et biophysica acta* 1783(5): 904–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339324> (May 25, 2014).
- Cuesta, Ana, Laia Pedrola, Teresa Sevilla, Javier García-Planells, María José Chumillas, Fernando Mayordomo, Eric LeGuern, Ignacio Marín, Juan J Vilchez, and Francesc Palau. 2002. "The Gene Encoding Ganglioside-Induced Differentiation-Associated Protein 1 Is Mutated in Axonal Charcot-Marie-Tooth Type 4A Disease." *Nature genetics* 30(1): 22–25.
- Cullinan, Sara B, and J Alan Diehl. 2004. "PERK-Dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival Following Endoplasmic Reticulum Stress." *The Journal of biological chemistry* 279(19): 20108–17.
- Cullinan, Sara B, John D Gordan, Jianping Jin, J Wade Harper, and J Alan Diehl. 2004. "The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase." *Molecular and cellular biology* 24(19): 8477–86.
- Cwerman-Thibault, Hélène, Sébastien Augustin, Sami Ellouze, José-Alain Sahel, and Marisol Corral-Debrinski. 2014. "Gene Therapy for Mitochondrial Diseases: Leber Hereditary Optic Neuropathy as the First Candidate for a Clinical Trial." *Comptes rendus biologies* 337(3): 193–206.
- Czabotar, Peter E, Guillaume Lessene, Andreas Strasser, and Jerry M Adams. 2014. "Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy." *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(1): 49–63.
- Danielson, Steven R, Jason M Held, May Oo, Rebecca Riley, Bradford W Gibson, and Julie K Andersen. 2011. "Quantitative Mapping of Reversible Mitochondrial Complex I Cysteine Oxidation in a Parkinson Disease Mouse Model." *The Journal of biological chemistry* 286(9): 7601–8.
- Darshi, Manjula, Vincent L Mendiola, Mason R Mackey, Anne N Murphy, Antonius Koller, Guy a Perkins, Mark H Ellisman, and Susan S Taylor. 2011. "ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function." *The Journal of biological chemistry* 286(4): 2918–32.
- Davey, G P, S Peuchen, and J B Clark. 1998. "Energy Thresholds in Brain Mitochondria. Potential Involvement in Neurodegeneration." *The Journal of biological chemistry* 273(21): 12753–57.
- Davies, Vanessa J, Andrew J Hollins, Malgorzata J Piechota, Wanfen Yip, Jennifer R Davies, Kathryn E White, Phillip P Nicols, Michael E Boulton, and Marcela Votruba. 2007. "Opa1 Deficiency in a Mouse Model of Autosomal Dominant Optic Atrophy Impairs Mitochondrial Morphology, Optic Nerve Structure and Visual Function." *Human molecular genetics* 16(11): 1307–18.
- Delettre, C, J M Griffoin, J Kaplan, H Dollfus, B Lorenz, L Faivre, G Lenaers, P Belenguer, and C P Hamel. 2001. "Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene." *Human Genetics* 109(6): 584–91.
- Delettre, C, G Lenaers, J M Griffoin, N Gigarel, C Lorenzo, P Belenguer, L Pelloquin, J Grosgeorge, C Turc-Carel, E Perret, C Astarie-Dequeker, L Lasquellec, B Arnaud, B Ducommun, J Kaplan, and C P Hamel. 2000a. "Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy [In Process Citation]." *Nat Genet* 26(2): 207–10.

- . 2000b. "Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy [In Process Citation]." *Nat Genet* 26(2): 207–10.
- Delivani, P, and S J Martin. 2006. "Mitochondrial Membrane Remodeling in Apoptosis: An inside Story." *Cell death and differentiation* 13(12): 2007–10.
- Denton, R M, and J G McCormack. 1980. "On the Role of the Calcium Transport Cycle in Heart and Other Mammalian Mitochondria." *FEBS letters* 119(1): 1–8.
- DePina, A S, and G M Langford. 1999. "Vesicle Transport: The Role of Actin Filaments and Myosin Motors." *Microscopy research and technique* 47(2): 93–106.
- Detmer, Scott A, and David C Chan. 2007. "Functions and Dysfunctions of Mitochondrial Dynamics." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(11): 870–79.
- Devenish, Rodney J, Mark Prescott, and Andrew J W Rodgers. 2008. "The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases." *International review of cell and molecular biology* 267: 1–58.
- Dexter, D T, J Sian, S Rose, J G Hindmarsh, V M Mann, J M Cooper, F R Wells, S E Daniel, A J Lees, and A H Schapira. 1994. "Indices of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Individuals with Incidental Lewy Body Disease." *Annals of neurology* 35(1): 38–44.
- Diaz, Francisca, Hirokazu Fukui, Sofia Garcia, and Carlos T Moraes. 2006. "Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts." *Molecular and cellular biology* 26(13): 4872–81.
- Diot, Alan, Emmanuelle Guillou, Marlène Daloyau, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J Emorine, and Pascale Belenguer. 2009. "Transmembrane Segments of the Dynamin Msp1p Uncouple Its Functions in the Control of Mitochondrial Morphology and Genome Maintenance." *Journal of cell science* 122(Pt 15): 2632–39.
- Divakaruni, Ajit S, and Martin D Brand. 2011. "The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak." *Physiology (Bethesda, Md.)* 26(3): 192–205.
- Dohm, Julie A, Sarah J Lee, J Marie Hardwick, R Blake Hill, and Apostolos G Gittis. 2004. "Cytosolic Domain of the Human Mitochondrial Fission Protein fis1 Adopts a TPR Fold." *Proteins* 54(1): 153–56.
- Dooley, Colette T, Timothy M Dore, George T Hanson, W Coyt Jackson, S James Remington, and Roger Y Tsien. 2004. "Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators." *The Journal of biological chemistry* 279(21): 22284–93.
- Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological reviews* 82(1): 47–95.
- Dudek, Jan, Peter Rehling, and Martin van der Laan. 2013. "Mitochondrial Protein Import: Common Principles and Physiological Networks." *Biochimica et biophysica acta* 1833(2): 274–85.
- Dudkina, Natalia V, Holger Eubel, Wilko Keegstra, Egbert J Boekema, and Hans-Peter Braun. 2005. "Structure of a Mitochondrial Supercomplex Formed by Respiratory-Chain Complexes I and III." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9): 3225–29.
- Dudkina, Natalya V, Stephanie Sunderhaus, Egbert J Boekema, and Hans-Peter Braun. 2008. "The Higher Level of Organization of the Oxidative Phosphorylation System: Mitochondrial Supercomplexes." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40(5): 419–24.
- Duvezin-Caubet, Stéphane, Mirko Koppen, Johannes Wagener, Michael Zick, Lars Israel, Andrea Bernacchia, Ravi Jagasia, Elena I Rugarli, Axel Imhof, Walter Neupert, Thomas Langer, and Andreas S Reichert. 2007. "OPA1 Processing Reconstituted in Yeast Depends on the Subunit Composition of the M-AAA Protease in Mitochondria." *Molecular biology of the cell* 18(9): 3582–90.
- Eckert, Gunter P, Christina Schiborr, Stephanie Hagl, Reham Abdel-Kader, Walter E Müller, Gerald Rimbach, and Jan Frank. 2013. "Curcumin Prevents Mitochondrial Dysfunction in the Brain of the Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8." *Neurochemistry international* 62(5): 595–602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23422877> (March 13, 2014).
- Ehses, Sarah, Ines Raschke, Giuseppe Mancuso, Andrea Bernacchia, Stefan Geimer, Daniel Tondera, Jean-Claude Martinou, Benedikt Westermann, Elena I Rugarli, and Thomas Langer. 2009. "Regulation of OPA1 Processing and Mitochondrial Fusion by M-AAA Protease Isoenzymes and OMA1." *The Journal of cell biology* 187(7): 1023–36.
- Elachouri, Ghizlane, Sara Vidoni, Claudia Zanna, Alexandre Pattyn, Hassan Boukhaddaoui, Karen Gaget, Patrick Yu-wai-man, Giuseppe Gasparre, Dominique Loiseau, Emmanuelle Sarzi, Valerio Carelli, Pascal Reynier, Patrick F Chinnery, Christian P Hamel, Michela Rugolo, Guy Lenaers, Inserm U-, Biologia Molecolare, and E Quagliariello. 2011. "OPA1 Links Human Mitochondrial Genome Maintenance to mtDNA Replication and Distribution." (33): 12–20.
- Ellouze, Sami, Sébastien Augustin, Aicha Bouaita, Crystel Bonnet, Manuel Simonutti, Valérie Forster, Serge Picaud, Jose-Alain Sahel, and Marisol Corral-Debrinski. 2008. "Optimized Allotopic Expression of the Human Mitochondrial ND4

- Prevents Blindness in a Rat Model of Mitochondrial Dysfunction." *American journal of human genetics* 83(3): 373–87.
- Enns, Gregory M. 2008. "Neurologic Damage and Neurocognitive Dysfunction in Urea Cycle Disorders." *Seminars in pediatric neurology* 15(3): 132–39.
- Esposito, L A, J E Kokoszka, K G Waymire, B Cottrell, G R MacGregor, and D C Wallace. 2000. "Mitochondrial Oxidative Stress in Mice Lacking the Glutathione Peroxidase-1 Gene." *Free radical biology & medicine* 28(5): 754–66.
- Eura, Yuka, Naotada Ishihara, Toshihiko Oka, and Katsuyoshi Mihara. 2006. "Identification of a Novel Protein That Regulates Mitochondrial Fusion by Modulating Mitofusin (Mfn) Protein Function." *Journal of cell science* 119(Pt 23): 4913–25.
- Eura, Yuka, Naotada Ishihara, Sadaki Yokota, and Katsuyoshi Mihara. 2003. "Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion." *Journal of biochemistry* 134(3): 333–44.
- Fang, Hsin-Yuan, Chih-Yi Chen, Shiow-Her Chiou, Yu-Ting Wang, Tze-Yi Lin, Hui-Wen Chang, I-Ping Chiang, Kuo-Jung Lan, and Kuan-Chih Chow. 2012. "Overexpression of Optic Atrophy 1 Protein Increases Cisplatin Resistance via Inactivation of Caspase-Dependent Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells." *Human pathology* 43(1): 105–14.
- Federico, Antonio, Elena Cardaioli, Paola Da Pozzo, Patrizia Formichi, Gian Nicola Gallus, and Elena Radi. 2012. "Mitochondria, Oxidative Stress and Neurodegeneration." *Journal of the neurological sciences* 322(1-2): 254–62.
- Feng, Du, Lei Liu, Yushan Zhu, and Quan Chen. 2013. "Molecular Signaling toward Mitophagy and Its Physiological Significance." *Experimental cell research* 319(12): 1697–1705.
- Fernández-Vizarra, Erika, Valeria Tiranti, and Massimo Zeviani. 2009. "Assembly of the Oxidative Phosphorylation System in Humans: What We Have Learned by Studying Its Defects." *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 200–211.
- Ferraris, Silvio, Susanna Clark, Emanuela Garelli, Guido Davidzon, Steven A Moore, Randy H Kardon, Rachelle J Bienstock, Matthew J Longley, Michelangelo Mancuso, Purificación Gutiérrez Ríos, Michio Hirano, William C Copeland, and Salvatore DiMauro. 2008. "Progressive External Ophthalmoplegia and Vision and Hearing Loss in a Patient with Mutations in POLG2 and OPA1." *Archives of neurology* 65(1): 125–31.
- Ferré, Marc, Dominique Bonneau, Dan Milea, Arnaud Chevrolier, Christophe Verny, Hélène Dollfus, Carmen Ayuso, Sabine Defoort, Catherine Vignal, Xavier Zanlonghi, Jean-Francois Charlin, Josseline Kaplan, Sylvie Odent, Christian P Hamel, Vincent Procaccio, Pascal Reynier, and Patrizia Amati-Bonneau. 2009. "Molecular Screening of 980 Cases of Suspected Hereditary Optic Neuropathy with a Report on 77 Novel OPA1 Mutations." *Human mutation* 30(7): E692–705.
- Finkel, T. 2001. "Reactive Oxygen Species and Signal Transduction." *IUBMB life* 52(1-2): 3–6.
- Finkel, T, and N J Holbrook. 2000. "Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing." *Nature* 408(6809): 239–47.
- Frank, S, B Gaume, E S Bergmann-Leitner, W W Leitner, E G Robert, F Catez, C L Smith, and R J Youle. 2001. "The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis." *Developmental cell* 1(4): 515–25.
- Frey, Terrence G, and Carmen A Mannella. 2000. "The Internal Structure of Mitochondria." *Trends in Biochemical Sciences* 25(7): 319–24.
- Frezza, Christian, Sara Cipolat, Olga Martins de Brito, Massimo Micaroni, Galina V Beznoussenko, Tomasz Rudka, Davide Bartoli, Roman S Polishuck, Nika N Danial, Bart De Strooper, and Luca Scorrano. 2006. "OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion." *Cell* 126(1): 177–89.
- Friedman, Jonathan R, Laura L Lackner, Matthew West, Jared R DiBenedetto, Jodi Nunnari, and Gia K Voeltz. 2011. "ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division." *Science (New York, N.Y.)* 334(6054): 358–62.
- Fritz, S, D Rapaport, E Klanner, W Neupert, and B Westermann. 2001. "Connection of the Mitochondrial Outer and Inner Membranes by Fzo1 Is Critical for Organellar Fusion." *The Journal of cell biology* 152(4): 683–92.
- Furt, Fabienne, and Patrick Moreau. 2009. "Importance of Lipid Metabolism for Intracellular and Mitochondrial Membrane Fusion/fission Processes." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10): 1828–36.
- Furukawa, Y, N Ikuta, S Omata, T Yamauchi, T Isobe, and T Ichimura. 1993. "Demonstration of the Phosphorylation-Dependent Interaction of Tryptophan Hydroxylase with the 14-3-3 Protein." *Biochem Biophys Res Commun* 194(1): 144–49.
- Gabaldón, Toni, and Martijn A Huynen. 2004. "Shaping the Mitochondrial Proteome." *Biochimica et biophysica acta* 1659(2-3): 212–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576054> (May 6, 2014).
- Galkin, Alexander, and Salvador Moncada. 2007. "S-Nitrosation of Mitochondrial Complex I Depends on Its Structural Conformation." *The Journal of biological chemistry* 282(52): 37448–53.
- Gan, Li, and Jeffrey a Johnson. 2013. "Oxidative Damage and the Nrf2-ARE Pathway in Neurodegenerative Diseases." *Biochimica et biophysica acta*.

- Gandhi, Sonia, Alison Wood-Kaczmar, Zhi Yao, Helene Plun-Favreau, Emma Deas, Kristina Klupsch, Julian Downward, David S Latchman, Sarah J Tabrizi, Nicholas W Wood, Michael R Duchen, and Andrey Y Abramov. 2009. "PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death." *Molecular cell* 33(5): 627–38.
- García-Ruiz, C, A Colell, M Mari, A Morales, and J C Fernández-Checa. 1997. "Direct Effect of Ceramide on the Mitochondrial Electron Transport Chain Leads to Generation of Reactive Oxygen Species. Role of Mitochondrial Glutathione." *The Journal of biological chemistry* 272(17): 11369–77.
- Garnier, A, D Fortin, C Deloménie, I Momken, V Veksler, and R Ventura-Clapier. 2003. "Depressed Mitochondrial Transcription Factors and Oxidative Capacity in Rat Failing Cardiac and Skeletal Muscles." *The Journal of physiology* 551(Pt 2): 491–501.
- Garrido, Nuria, Lorena Griparic, Eija Jokitalo, Jorma Wartiovaara, Alexander M van der Bliek, and Johannes N Spelbrink. 2003. "Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids." *Molecular biology of the cell* 14(4): 1583–96.
- Gegg, Matthew E, J Mark Cooper, Kai-Yin Chau, Manuel Rojo, Anthony H V Schapira, and Jan-Willem Taanman. 2010. "Mitofusin 1 and Mitofusin 2 Are Ubiquitinated in a PINK1/parkin-Dependent Manner upon Induction of Mitophagy." *Human molecular genetics* 19(24): 4861–70.
- Genova, M L, A Baracca, A Biondi, G Casalena, M Faccioli, A I Falasca, G Formiggini, G Sgarbi, G Solaini, and G Lenaz. "Is Supercomplex Organization of the Respiratory Chain Required for Optimal Electron Transfer Activity?" *Biochimica et biophysica acta* 1777(7-8): 740–46.
- Geremia, E, D Baratta, S Zafarana, R Giordano, M R Pinizzotto, M G La Rosa, and a Garozzo. 1990. "Antioxidant Enzymatic Systems in Neuronal and Glial Cell-Enriched Fractions of Rat Brain during Aging." *Neurochemical research* 15(7): 719–23.
- Geromel, Vanna, Niklas Darin, Dominique Chrétien, Paule Bénit, Pascale DeLonlay, Agnès Rötig, Arnold Munnich, and Pierre Rustin. "Coenzyme Q(10) and Idebenone in the Therapy of Respiratory Chain Diseases: Rationale and Comparative Benefits." *Molecular genetics and metabolism* 77(1-2): 21–30.
- Girard, Martine, Roxanne Larivière, David A Parfitt, Emily C Deane, Rebecca Gaudet, Nadya Nossova, Francois Blondeau, George Prenosil, Esmeralda G M Vermeulen, Michael R Duchen, Andrea Richter, Eric A Shoubridge, Kalle Gehring, R Anne McKinney, Bernard Brais, J Paul Chapple, and Peter S McPherson. 2012. "Mitochondrial Dysfunction and Purkinje Cell Loss in Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(5): 1661–66.
- Gleason, Cynthia, Shaobai Huang, Louise F Thatcher, Rhonda C Foley, Carol R Anderson, Adam J Carroll, A Harvey Millar, and Karam B Singh. 2011. "Mitochondrial Complex II Has a Key Role in Mitochondrial-Derived Reactive Oxygen Species Influence on Plant Stress Gene Regulation and Defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(26): 10768–73.
- Gleyzer, Natalie, Kristel Vercauteren, and Richard C Scarpulla. 2005. "Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators." *Molecular and cellular biology* 25(4): 1354–66.
- Gomes, Ligia C, Giulietta Di Benedetto, and Luca Scorrano. 2011. "During Autophagy Mitochondria Elongate, Are Spared from Degradation and Sustain Cell Viability." *Nature cell biology* 13(5): 589–98.
- Gomes, Ligia C, and Luca Scorrano. 2011. "Mitochondrial Elongation during Autophagy: A Stereotypical Response to Survive in Difficult Times." *Autophagy* 7(10): 1251–53.
- Gómez, Luis A, Jeffrey S Monette, Juan D Chavez, Claudia S Maier, and Tory M Hagen. 2009. "Supercomplexes of the Mitochondrial Electron Transport Chain Decline in the Aging Rat Heart." *Archives of biochemistry and biophysics* 490(1): 30–35.
- Gomez-Cabrera, Mari Carmen, Fabian Sanchis-Gomar, Rebeca Garcia-Valles, Helios Pareja-Galeano, Juan Gambini, Consuelo Borrás, and Jose Viña. 2012. "Mitochondria as Sources and Targets of Damage in Cellular Aging." *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 50(8): 1287–95.
- Grau, Tanja, Lena F Burbulla, Gertraud Engl, Cécile Delettre, Benjamin Delprat, Konrad Oexle, Beate Leo-Kottler, Tony Roscioli, Rejko Krüger, Doron Rapaport, Bernd Wissinger, and Simone Schimpf-Linzenbold. 2013. "A Novel Heterozygous OPA3 Mutation Located in the Mitochondrial Target Sequence Results in Altered Steady-State Levels and Fragmented Mitochondrial Network." *Journal of medical genetics* 50(12): 848–58.
- Greene, Jessica C, Alexander J Whitworth, Isabella Kuo, Laurie A Andrews, Mel B Feany, and Leo J Pallanck. 2003. "Mitochondrial Pathology and Apoptotic Muscle Degeneration in Drosophila Parkin Mutants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 4078–83.

- Grimm, Stefan, and Dieter Brdiczka. 2007. "The Permeability Transition Pore in Cell Death." *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 12(5): 841–55.
- Griparic, Lorena, Takayuki Kanazawa, and Alexander M van der Bliek. 2007. "Regulation of the Mitochondrial Dynamin-like Protein Opa1 by Proteolytic Cleavage." *The Journal of cell biology* 178(5): 757–64.
- Griparic, Lorena, Nicole N van der Wel, Ian J Orozco, Peter J Peters, and Alexander M van der Bliek. 2004. "Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 279(18): 18792–98.
- Grover, Gary J, Palma Ann Marone, Lee Koetzner, and Donna Seto-Young. 2008. "Energetic Signalling in the Control of Mitochondrial F1F0 ATP Synthase Activity in Health and Disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(12): 2698–2701.
- Grünewald, Anne, Lisa Voges, Aleksandar Rakovic, Meike Kasten, Himesha Vandebona, Claudia Hemmelmann, Katja Lohmann, Slobodanka Orolicki, Alfredo Ramirez, Anthony H V Schapira, Peter P Pramstaller, Carolyn M Sue, and Christine Klein. 2010. "Mutant Parkin Impairs Mitochondrial Function and Morphology in Human Fibroblasts." *PloS one* 5(9): e12962.
- Guan, K, L Farh, T K Marshall, and R J Deschenes. 1993. "Normal Mitochondrial Structure and Genome Maintenance in Yeast Requires the Dynamine-like Product of the MGM1 Gene." *Curr. Genet.* 24(1-2): 141–48.
- Guan, Kun-Liang, and Yue Xiong. 2011. "Regulation of Intermediary Metabolism by Protein Acetylation." *Trends in biochemical sciences* 36(2): 108–16.
- Guillery, O, F Malka, T Landes, E Guillou, C Blackstone, A Lombes, P Belenguer, D Arnoult, and M Rojo. 2008. "Metalloprotease-Mediated OPA1 Processing Is Modulated by the Mitochondrial Membrane Potential." *Biol Cell* 100(5): 315–25.
- Guillou, E, C Bousquet, M Daloyau, L J Emorine, and P Belenguer. 2005. "Msp1p Is an Intermembrane Space Dynamin-Related Protein That Mediates Mitochondrial Fusion in a Dnm1p-Dependent Manner in *S. Pombe*." *FEBS Lett* 579(5): 1109–16.
- Gupta, Subash C, Sridevi Patchva, and Bharat B Aggarwal. 2013. "Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials." *The AAPS journal* 15(1): 195–218.
- Gutteridge, J M. 1994. "Biological Origin of Free Radicals, and Mechanisms of Antioxidant Protection." *Chemico-biological interactions* 91(2-3): 133–40.
- Guzy, Robert D, Beatrice Hoyos, Emmanuel Robin, Hong Chen, Liping Liu, Kyle D Mansfield, M Celeste Simon, Ulrich Hammerling, and Paul T Schumacker. 2005. "Mitochondrial Complex III Is Required for Hypoxia-Induced ROS Production and Cellular Oxygen Sensing." *Cell metabolism* 1(6): 401–8.
- Guzy, Robert D, Bhumika Sharma, Eric Bell, Navdeep S Chandel, and Paul T Schumacker. 2008. "Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis." *Molecular and cellular biology* 28(2): 718–31.
- De Haan, Judy B, Cecile Bladier, Mehrnosh Lotfi-Miri, Juliet Taylor, Paul Hutchinson, Peter J Crack, Paul Hertzog, and Ismail Kola. 2004. "Fibroblasts Derived from Gpx1 Knockout Mice Display Senescent-like Features and Are Susceptible to H2O2-Mediated Cell Death." *Free radical biology & medicine* 36(1): 53–64.
- Habersetzer, Johan, Widade Ziani, Isabelle Larrieu, Claire Stines-Chaumeil, Marie-France Giraud, Daniel Brèthes, Alain Dautant, and Patrick Paumard. 2013. "ATP Synthase Oligomerization: From the Enzyme Models to the Mitochondrial Morphology." *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(1): 99–105.
- Habersetzer, Johann, Isabelle Larrieu, Muriel Priault, Bénédicte Salin, Rodrigue Rossignol, Daniel Brèthes, and Patrick Paumard. 2013. "Human F1F0 ATP Synthase, Mitochondrial Ultrastructure and OXPHOS Impairment: A (super-)complex Matter?" *PloS one* 8(10): e75429.
- Haefeli, Roman H, Michael Erb, Anja C Gemperli, Dimitri Robay, Isabelle Courdier Fruh, Corinne Anklin, Robert Dallmann, and Nuri Gueven. 2011. "NQO1-Dependent Redox Cycling of Idebenone: Effects on Cellular Redox Potential and Energy Levels." *PloS one* 6(3): e17963.
- Han, Bingnan, Harald Gross, Douglas E Goeger, Susan L Mooberry, and William H Gerwick. 2006. "Aurilides B and C, Cancer Cell Toxins from a Papua New Guinea Collection of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*." *Journal of natural products* 69(4): 572–75.
- Han, Xiao-Jian, Yun-Fei Lu, Shun-Ai Li, Taku Kaitsuka, Yasufumi Sato, Kazuhito Tomizawa, Angus C Nairn, Kohji Takei, Hideki Matsui, and Masayuki Matsushita. 2008. "CaM Kinase I Alpha-Induced Phosphorylation of Drp1 Regulates Mitochondrial Morphology." *The Journal of cell biology* 182(3): 573–85.

- Hanein, Sylvain, Isabelle Perrault, Olivier Roche, Sylvie Gerber, Noman Khadom, Marlene Rio, Nathalie Boddaert, Marc Jean-Pierre, Nora Brahimi, Valérie Serre, Dominique Chretien, Nathalie Delphin, Lucas Fares-Taie, Sahran Lachheb, Agnès Rotig, Françoise Meire, Arnold Munnich, Jean-Louis Dufier, Josseline Kaplan, and Jean-Michel Rozet. 2009. "TMEM126A, Encoding a Mitochondrial Protein, Is Mutated in Autosomal-Recessive Nonsyndromic Optic Atrophy." *American journal of human genetics* 84(4): 493–98.
- Hansford, R G, R Moreno-Sánchez, and B Lewartowski. 1989. "Activation of Pyruvate Dehydrogenase Complex by  $\text{Ca}^{2+}$  in Intact Heart, Cardiac Myocytes, and Cardiac Mitochondria." *Annals of the New York Academy of Sciences* 573: 240–53.
- Hanson, George T, Robert Aggeler, Devin Oglesbee, Mark Cannon, Roderick A Capaldi, Roger Y Tsien, and S James Remington. 2004. "Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators." *The Journal of biological chemistry* 279(13): 13044–53.
- Harder, Zdena, Rodolfo Zunino, and Heidi McBride. 2004. "Sumo1 Conjugates Mitochondrial Substrates and Participates in Mitochondrial Fission." *Current biology : CB* 14(4): 340–45.
- HARMAN, D. 1956. "Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry." *Journal of gerontology* 11(3): 298–300.
- Hart, Paul E, Raffaele Lodi, Bheeshma Rajagopalan, Jane L Bradley, Jenifer G Crilley, Christopher Turner, Andrew M Blamire, David Manners, Peter Styles, Anthony H V Schapira, and J Mark Cooper. 2005. "Antioxidant Treatment of Patients with Friedreich Ataxia: Four-Year Follow-Up." *Archives of neurology* 62(4): 621–26.
- Head, Brian, Lorena Griparic, Mandana Amiri, Shilpa Gandre-Babbe, and Alexander M van der Bliek. 2009. "Inducible Proteolytic Inactivation of OPA1 Mediated by the OMA1 Protease in Mammalian Cells." *The Journal of cell biology* 187(7): 959–66.
- Hebert-Chatelain, Etienne. 2013. "Src Kinases Are Important Regulators of Mitochondrial Functions." *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(1): 90–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951354> (May 25, 2014).
- Van Heeke, G, L Deforce, R A Schnizer, R Shaw, J M Couton, G Shaw, P S Song, and S M Schuster. 1993. "Recombinant Bovine Heart Mitochondrial F1-ATPase Inhibitor Protein: Overproduction in Escherichia Coli, Purification, and Structural Studies." *Biochemistry* 32(38): 10140–49.
- Heinemeyer, Jesco, Hans-Peter Braun, Egbert J Boekema, and Roman Kouril. 2007. "A Structural Model of the Cytochrome C Reductase/oxidase Supercomplex from Yeast Mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 282(16): 12240–48.
- Heiss, Elke H, Daniel Schachner, Kristin Zimmermann, and Verena M Dirsch. 2013. "Glucose Availability Is a Decisive Factor for Nrf2-Mediated Gene Expression." *Redox biology* 1(1): 359–65.
- Helling, Stefan, Maik Hüttemann, Rabia Ramzan, Su Hyeon Kim, Icksoo Lee, Thorsten Müller, Elmar Langenfeld, Helmut E Meyer, Bernhard Kadenbach, Sebastian Vogt, and Katrin Marcus. 2012. "Multiple Phosphorylations of Cytochrome c Oxidase and Their Functions." *Proteomics* 12(7): 950–59.
- Hermann, G J, and J M Shaw. 1998. "Mitochondrial Dynamics in Yeast." *Annual review of cell and developmental biology* 14: 265–303.
- Hermann, G J, J W Thatcher, J P Mills, K G Hales, M T Fuller, J Nunnari, and J M Shaw. 1998. "Mitochondrial Fusion in Yeast Requires the Transmembrane GTPase Fzo1p." *J Cell Biol* 143(2): 359–73.
- Hinton, D R, A A Sadun, J C Blanks, and C A Miller. 1986. "Optic-Nerve Degeneration in Alzheimer's Disease." *The New England journal of medicine* 315(8): 485–87.
- Ho, Daniel J, Noel Y Calingasan, Elizabeth Wille, Magali Dumont, and M Flint Beal. 2010. "Resveratrol Protects against Peripheral Deficits in a Mouse Model of Huntington's Disease." *Experimental neurology* 225(1): 74–84.
- Ho, Ye-Shih, Ye Xiong, Wanchao Ma, Abraham Spector, and Dorothy S Ho. 2004. "Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury." *The Journal of biological chemistry* 279(31): 32804–12.
- Hock, M Benjamin, and Anastasia Kralli. 2009. "Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function." *Annual review of physiology* 71: 177–203.
- Hood, D A. 2001. "Invited Review: Contractile Activity-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle." *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 90(3): 1137–57.
- Hoppins, Suzanne. 2014. "The Regulation of Mitochondrial Dynamics." *Current opinion in cell biology* 29C: 46–52.
- Hoppins, Suzanne, and Jodi Nunnari. 2009. "The Molecular Mechanism of Mitochondrial Fusion." *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 20–26.

- Howitz, Konrad T, Kevin J Bitterman, Haim Y Cohen, Dudley W Lamming, Siva Lavu, Jason G Wood, Robert E Zipkin, Phuong Chung, Anne Kisieleski, Li-Li Zhang, Brandy Scherer, and David A Sinclair. 2003. "Small Molecule Activators of Sirtuins Extend *Saccharomyces Cerevisiae* Lifespan." *Nature* 425(6954): 191–96.
- Hoyt, C S. 1980. "Autosomal Dominant Optic Atrophy. A Spectrum of Disability." *Ophthalmology* 87(3): 245–51.
- Hu, Rong, Constance Lay-Lay Saw, Rong Yu, and Ah-Ng Tony Kong. 2010. "Regulation of NF-E2-Related Factor 2 Signaling for Cancer Chemoprevention: Antioxidant Coupled with Antiinflammatory." *Antioxidants & redox signaling* 13(11): 1679–98.
- Huang, Chin-Chang, Hung-Chou Kuo, Chun-Che Chu, and Ling-Yuh Kao. 2002. "Rapid Visual Recovery after Coenzyme q10 Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy." *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 22(1): 66.
- Huang, X J, C X Song, C Q Zhong, and F S Wang. 2012. "Research Progress in the Radioprotective Effect of Superoxide Dismutase." *Drug discoveries & therapeutics* 6(4): 169–77.
- Huber, Nina, Sofia Guimaraes, Michael Schrader, Ueli Suter, and Axel Niemann. 2013. "Charcot-Marie-Tooth Disease-Associated Mutants of GDAP1 Dissociate Its Roles in Peroxisomal and Mitochondrial Fission." *EMBO reports* 14(6): 545–52.
- Hudson, G, P Amati-Bonneau, E L Blakely, J D Stewart, L He, A M Schaefer, P G Griffiths, K Ahlqvist, A Suomalainen, P Reynier, R McFarland, D M Turnbull, P F Chinnery, and R W Taylor. 2008. "Mutation of OPA1 Causes Dominant Optic Atrophy with External Ophthalmoplegia, Ataxia, Deafness and Multiple Mitochondrial DNA Deletions: A Novel Disorder of mtDNA Maintenance." *Brain* 131(Pt 2): 329–37.
- Hudson, Gavin, Patrizia Amati-Bonneau, Emma L Blakely, Joanna D Stewart, Langping He, Andrew M Schaefer, Philip G Griffiths, Kati Ahlqvist, Anu Suomalainen, Pascal Reynier, Robert McFarland, Douglass M Turnbull, Patrick F Chinnery, and Robert W Taylor. 2008. "Mutation of OPA1 Causes Dominant Optic Atrophy with External Ophthalmoplegia, Ataxia, Deafness and Multiple Mitochondrial DNA Deletions: A Novel Disorder of mtDNA Maintenance." *Brain* 131(Pt 2): 329–37.
- Hudson, Gavin, Patrick Yu-Wai-Man, Phillip G Griffiths, Leonardo Caporali, Solange S Salomao, Adriana Berezovsky, Valerio Carelli, Massimo Zeviani, and Patrick F Chinnery. 2010. "Variation in OPA1 Does Not Explain the Incomplete Penetrance of Leber Hereditary Optic Neuropathy." *Molecular vision* 16(September): 2760–64.
- Hurd, Thomas R, Raquel Requejo, Aleksandra Filipovska, Stephanie Brown, Tracy A Prime, Alan J Robinson, Ian M Fearnley, and Michael P Murphy. 2008. "Complex I within Oxidatively Stressed Bovine Heart Mitochondria Is Glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa Subunit: Potential Role of CYS Residues in Decreasing Oxidative Damage." *The Journal of biological chemistry* 283(36): 24801–15.
- Hutny, J, and J E Wilson. 2000. "Further Studies on the Role of Phospholipids in Determining the Characteristics of Mitochondrial Binding Sites for Type I Hexokinase." *Acta biochimica Polonica* 47(4): 1045–60.
- Ibi, Masakazu, Masato Katsuyama, ChunYuan Fan, Kazumi Iwata, Toru Nishinaka, Takahiko Yokoyama, and Chihiro Yabe-Nishimura. 2006. "NOX1/NADPH Oxidase Negatively Regulates Nerve Growth Factor-Induced Neurite Outgrowth." *Free radical biology & medicine* 40(10): 1785–95.
- Imamura, Hiromi, Kim P Huynh Nhat, Hiroko Togawa, Kenta Saito, Ryota Iino, Yasuyuki Kato-Yamada, Takeharu Nagai, and Hiroyuki Noji. 2009. "Visualization of ATP Levels inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(37): 15651–56.
- Ishihara, Naotada, Yuka Eura, and Katsuyoshi Mihara. 2004. "Mitofusin 1 and 2 Play Distinct Roles in Mitochondrial Fusion Reactions via GTPase Activity." *Journal of cell science* 117(Pt 26): 6535–46.
- Ishihara, Naotada, Masatoshi Nomura, Akihiro Jofuku, Hiroki Kato, Satoshi O Suzuki, Keiji Masuda, Hidenori Otera, Yae Nakanishi, Ikuya Nonaka, Yu-Ichi Goto, Naoko Taguchi, Hidetaka Morinaga, Maki Maeda, Ryoichi Takayanagi, Sadaki Yokota, and Katsuyoshi Mihara. 2009. "Mitochondrial Fission Factor Drp1 Is Essential for Embryonic Development and Synapse Formation in Mice." *Nature cell biology* 11(8): 958–66.
- Itoh, K, T Chiba, S Takahashi, T Ishii, K Igarashi, Y Katoh, T Oyake, N Hayashi, K Satoh, I Hatayama, M Yamamoto, and Y Nabeshima. 1997. "An Nrf2/small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements." *Biochemical and biophysical research communications* 236(2): 313–22.
- Itoh, K, N Wakabayashi, Y Katoh, T Ishii, K Igarashi, J D Engel, and M Yamamoto. 1999. "Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Responsive Elements by Nrf2 through Binding to the Amino-Terminal Neh2 Domain." *Genes & development* 13(1): 76–86.



- Itoh, Ken, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Tetsuro Ishii, Tania O'Connor, and Masayuki Yamamoto. 2003. "Keap1 Regulates Both Cytoplasmic-Nuclear Shuttling and Degradation of Nrf2 in Response to Electrophiles." *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8(4): 379–91.
- Jain, Abhinav K, David A Bloom, and Anil K Jaiswal. 2005. "Nuclear Import and Export Signals in Control of Nrf2." *The Journal of biological chemistry* 280(32): 29158–68.
- Jakobs, Stefan, Nadia Martini, Astrid C Schauss, Alexander Egner, Benedikt Westermann, and Stefan W Hell. 2003. "Spatial and Temporal Dynamics of Budding Yeast Mitochondria Lacking the Division Component Fis1p." *Journal of cell science* 116(Pt 10): 2005–14.
- Jayashankar, Vaishali, and Susanne M Rafelski. 2014. "Integrating Mitochondrial Organization and Dynamics with Cellular Architecture." *Current opinion in cell biology* 26: 34–40. h
- Jefferies, John L. 2013. "Barth Syndrome." *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 163C(3): 198–205.
- Jeong, Sun-Oh, Gi-Su Oh, Hun-Yong Ha, Bon Soon Koo, Hak Sung Kim, Youn-Chul Kim, Eun-Cheol Kim, Kang-Min Lee, Hun-Taeg Chung, and Hyun-Ock Pae. 2009. "Dimethoxycurcumin, a Synthetic Curcumin Analogue, Induces Heme Oxygenase-1 Expression through Nrf2 Activation in RAW264.7 Macrophages." *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 44(1): 79–84.
- Jin, Youngnam N, Yanxun V Yu, Soner Gundemir, Chulman Jo, Mei Cui, Kim Tieu, and Gail V W Johnson. 2013. "Impaired Mitochondrial Dynamics and Nrf2 Signaling Contribute to Compromised Responses to Oxidative Stress in Striatal Cells Expressing Full-Length Mutant Huntingtin." ed. Frédéric Saudou. *PLoS one* 8(3): e57932.
- Jonckheere, An I, Jan a M Smeitink, and Richard J T Rodenburg. 2012. "Mitochondrial ATP Synthase: Architecture, Function and Pathology." *Journal of inherited metabolic disease* 35(2): 211–25.
- Jones, B A, and W L Fangman. 1992. "Mitochondrial DNA Maintenance in Yeast Requires a Protein Containing a Region Related to the GTP-Binding Domain of Dynamin." *Genes & Dev.* 6(3): 380–89.
- Ju, Won-Kyu, Keun-Young Kim, Karen X Duong-Polk, James D Lindsey, Mark H Ellisman, and Robert N Weinreb. 2010. "Increased Optic Atrophy Type 1 Expression Protects Retinal Ganglion Cells in a Mouse Model of Glaucoma." *Molecular vision* 16(July): 1331–42.
- Kagan, V E, Y Y Tyurina, H Bayir, C T Chu, A A Kapralov, I I Vlasova, N A Belikova, V A Tyurin, A Amoscato, M Epperly, J Greenberger, S Dekosky, A A Shvedova, and J Jiang. 2006. "The 'pro-Apoptotic Genies' Get out of Mitochondria: Oxidative Lipidomics and Redox Activity of Cytochrome C/cardiolipin Complexes." *Chemico-biological interactions* 163(1-2): 15–28.
- Kamei, Satomi, Murielle Chen-Kuo-Chang, Chantal Cazevieille, Guy Lenaers, Aurélien Olichon, Pascale Bélanguer, Gautier Roussignol, Nicole Renard, Michel Eybalin, Adeline Michelin, Cécile Delettre, Philippe Brabet, and Christian P Hamel. 2005. "Expression of the Opa1 Mitochondrial Protein in Retinal Ganglion Cells: Its Downregulation Causes Aggregation of the Mitochondrial Network." *Investigative ophthalmology & visual science* 46(11): 4288–94.
- Kanazawa, Takayuki, Mauro D Zappaterra, Ayako Hasegawa, Ashley P Wright, Erin D Newman-Smith, Karolyn F Buttle, Kent McDonald, Carmen A Mannella, and Alexander M van der Bliek. 2008. "The C. Elegans Opa1 Homologue EAT-3 Is Essential for Resistance to Free Radicals." *PLoS genetics* 4(2): e1000022.
- Kane, Lesley A, and Jennifer E Van Eyk. 2009. "Post-Translational Modifications of ATP Synthase in the Heart: Biology and Function." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41(2): 145–50.
- Kang, Moon-Il, Akira Kobayashi, Nobunao Wakabayashi, Sang-Geon Kim, and Masayuki Yamamoto. 2004. "Scaffolding of Keap1 to the Actin Cytoskeleton Controls the Function of Nrf2 as Key Regulator of Cytoprotective Phase 2 Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7): 2046–51.
- Kanzaki, Hiroyuki, Fumiaki Shinohara, Mikihiro Kajiya, and Tetsuya Kodama. 2013. "The Keap1/Nrf2 Protein Axis Plays a Role in Osteoclast Differentiation by Regulating Intracellular Reactive Oxygen Species Signaling." *The Journal of biological chemistry* 288(32): 23009–20.
- Karbowski, Mariusz, Seon-Yong Jeong, and Richard J Youle. 2004. "Endophilin B1 Is Required for the Maintenance of Mitochondrial Morphology." *The Journal of cell biology* 166(7): 1027–39.
- Karbowski, Mariusz, Yang-Ja Lee, Brigitte Gaume, Seon-Yong Jeong, Stephan Frank, Amotz Nechushtan, Ansgar Santel, Margaret Fuller, Carolyn L Smith, and Richard J Youle. 2002. "Spatial and Temporal Association of Bax with Mitochondrial Fission Sites, Drp1, and Mfn2 during Apoptosis." *The Journal of cell biology* 159(6): 931–38.
- Karbowski, Mariusz, Albert Neutznier, and Richard J Youle. 2007. "The Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase MARCH5 Is Required for Drp1 Dependent Mitochondrial Division." *The Journal of cell biology* 178(1): 71–84.

- Kaufman, Randal J, and Jyoti D Malhotra. 2014. "Calcium Trafficking Integrates Endoplasmic Reticulum Function with Mitochondrial Bioenergetics." *Biochimica et biophysica acta*.
- Kawamura, Michiko, Hidenori Inaoka, Shuichi Obata, and Yoshiteru Harada. 2014. "Why Do a Wide Variety of Animals Retain Multiple Isoforms of Cyclooxygenase?" *Prostaglandins & other lipid mediators*.
- Kayo, T, D B Allison, R Weindruch, and T A Prolla. 2001. "Influences of Aging and Caloric Restriction on the Transcriptional Profile of Skeletal Muscle from Rhesus Monkeys." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(9): 5093–98.
- Kensler, Thomas W, Nobunao Wakabayashi, and Shyam Biswal. 2007. "Cell Survival Responses to Environmental Stresses via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway." *Annual review of pharmacology and toxicology* 47: 89–116.
- Kerner, J, and C Hoppel. 2000. "Fatty Acid Import into Mitochondria." *Biochimica et biophysica acta* 1486(1): 1–17.
- Kerr, Douglas S. 2010. "Treatment of Mitochondrial Electron Transport Chain Disorders: A Review of Clinical Trials over the Past Decade." *Molecular genetics and metabolism* 99(3): 246–55.
- Keum, Young-Sam. 2012. "Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-Oxidant Genes." *Biomolecules & therapeutics* 20(2): 144–51.
- Khan, Mohd Moshahid, Ajmal Ahmad, Tauheed Ishrat, M Badruzzaman Khan, Md Nasrul Hoda, Gulrana Khuwaja, Syed Shadab Raza, Andleeb Khan, Hayate Javed, Kumar Vaibhav, and Fakhrul Islam. 2010. "Resveratrol Attenuates 6-Hydroxydopamine-Induced Oxidative Damage and Dopamine Depletion in Rat Model of Parkinson's Disease." *Brain research* 1328: 139–51.
- Kilinc, Devrim, Jean-Michel Peyrin, Vanessa Soubeyre, Sébastien Magnifico, Laure Saias, Jean-Louis Viovy, and Bernard Brugg. 2010. "Wallerian-Like Degeneration of Central Neurons After Synchronized and Geometrically Registered Mass Axotomy in a Three-Compartmental Microfluidic Chip." *Neurotoxicity Research* 19(1): 149–61.
- Kim, Insil, Sara Rodriguez-Enriquez, and John J Lemasters. 2007. "Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy." *Archives of biochemistry and biophysics* 462(2): 245–53.
- Kim, J Y, J-M Hwang, H S Ko, M-W Seong, B-J Park, and S S Park. 2005. "Mitochondrial DNA Content Is Decreased in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Neurology* 64(6): 966–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781809> (May 25, 2014).
- Kim, Ki Mo, Hyun-Ock Pae, Min Zheng, Raekil Park, Young-Myeong Kim, and Hun-Taeg Chung. 2007. "Carbon Monoxide Induces Heme Oxygenase-1 via Activation of Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase and Inhibits Endothelial Cell Apoptosis Triggered by Endoplasmic Reticulum Stress." *Circulation research* 101(9): 919–27.
- Kirkwood, Thomas B L. 2005. "Understanding the Odd Science of Aging." *Cell* 120(4): 437–47.
- Kirkwood, Thomas B L, and Daryl P Shanley. 2005. "Food Restriction, Evolution and Ageing." *Mechanisms of ageing and development* 126(9): 1011–16.
- Kjer, B. 1959. "Infantile Optic Atrophy with Dominant Mode of Inheritance : A Clinical and Genetic Study of 19 Danish Families." *Acta ophthalmol. Scand.* 37(54): 1–146.
- Kleikers, Pamela W M, K Wingler, J J R Hermans, I Diebold, S Altenhöfer, K A Radermacher, B Janssen, A Görlach, and H H H W Schmidt. 2012. "NADPH Oxidases as a Source of Oxidative Stress and Molecular Target in Ischemia/reperfusion Injury." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90(12): 1391–1406.
- Klepinin, Aleksandr, Vladimir Chekulayev, Natalja Timohhina, Igor Shevchuk, Kersti Tepp, Andrus Kaldma, Andre Koit, Valdur Saks, and Tuuli Kaambre. 2014. "Comparative Analysis of Some Aspects of Mitochondrial Metabolism in Differentiated and Undifferentiated Neuroblastoma Cells." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 46(1): 17–31.
- Kline, L B, and J S Glaser. 1979. "Dominant Optic Atrophy. The Clinical Profile." *Archives of ophthalmology* 97(9): 1680–86.
- Klopstock, T, M Elstner, and A Bender. 2011. "Creatine in Mouse Models of Neurodegeneration and Aging." *Amino acids* 40(5): 1297–1303.
- Kobayashi, Makoto, Ken Itoh, Takafumi Suzuki, Hitoshi Osanai, Keizo Nishikawa, Yasutake Katoh, Yaeko Takagi, and Masayuki Yamamoto. 2002. "Identification of the Interactive Interface and Phylogenic Conservation of the Nrf2-Keap1 System." *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7(8): 807–20.
- Kobayashi, Makoto, and Masayuki Yamamoto. 2006. "Nrf2-Keap1 Regulation of Cellular Defense Mechanisms against Electrophiles and Reactive Oxygen Species." *Advances in enzyme regulation* 46: 113–40.
- Kobayashi, T, S Tsunawaki, and H Seguchi. 2001. "Evaluation of the Process for Superoxide Production by NADPH Oxidase in Human Neutrophils: Evidence for Cytoplasmic Origin of Superoxide." *Redox Rep* 6(1): 27–36.

- Kokoszka, J E, P Coskun, L A Esposito, and D C Wallace. 2001. "Increased Mitochondrial Oxidative Stress in the Sod2 (+/-) Mouse Results in the Age-Related Decline of Mitochondrial Function Culminating in Increased Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5): 2278–83.
- Koo, Hshi-Chi, Jonathan M Davis, Yuchi Li, Dimitrios Hatzis, Harry Opsimos, Simcha Pollack, Marlene S Strayer, Philip L Ballard, and Jeffrey a Kazzaz. 2005. "Effects of Transgene Expression of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase on Pulmonary Epithelial Cell Growth in Hyperoxia." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 288(4): L718–26.
- Koopman, Werner J H, Felix Distelmaier, Jan a M Smeitink, and Peter H G M Willems. 2013. "OXPHOS Mutations and Neurodegeneration." *The EMBO journal* 32(1): 9–29.
- Koopman, Werner J H, Leo G J Nijtmans, Cindy E J Dieteren, Peggy Roestenberg, Federica Valsecchi, Jan A M Smeitink, and Peter H G M Willems. 2010. "Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation." *Antioxidants & redox signaling* 12(12): 1431–70.
- Kosaka, Kunio, Junsei Mimura, Ken Itoh, Takumi Satoh, Yosuke Shimojo, Chieko Kitajima, Atsushi Maruyama, Masayuki Yamamoto, and Takuji Shirasawa. 2010. "Role of Nrf2 and p62/ZIP in the Neurite Outgrowth by Carnosic Acid in PC12h Cells." *Journal of biochemistry* 147(1): 73–81.
- Koshiba, Takumi, Scott A Detmer, Jens T Kaiser, Hsiuchen Chen, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2004. "Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes." *Science (New York, N.Y.)* 305(5685): 858–62.
- Krieg, Peter, and Gerhard Fürstenberger. 2014. "The Role of Lipoxygenases in Epidermis." *Biochimica et biophysica acta* 1841(3): 390–400.
- Kumar, Anil, Neha Sharma, Jitendriya Mishra, and Harikesh Kalonia. 2013. "Synergistical Neuroprotection of Rofecoxib and Statins against Malonic Acid Induced Huntington's Disease like Symptoms and Related Cognitive Dysfunction in Rats." *European journal of pharmacology* 709(1-3): 1–12.
- Kushibiki, Toshihiro, Takeshi Hirasawa, Shinpei Okawa, and Miya Ishihara. 2013. "Blue Laser Irradiation Generates Intracellular Reactive Oxygen Species in Various Types of Cells." *Photomedicine and laser surgery* 31(3): 95–104.
- Kuznetsov, Andrey V, Martin Hermann, Valdur Saks, Paul Hengster, and Raimund Margreiter. 2009. "The Cell-Type Specificity of Mitochondrial Dynamics." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10): 1928–39.
- Kuznetsov, Andrey V, and Raimund Margreiter. 2009. "Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity." *International journal of molecular sciences* 10(4): 1911–29.
- Van der Laan, Martin, Michael Rissler, and Peter Rehling. 2006. "Mitochondrial Preprotein Translocases as Dynamic Molecular Machines." *FEMS yeast research* 6(6): 849–61.
- Labrousse, A M, M D Zappaterra, D A Rube, and A M van der Blik. 1999. "C. Elegans Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane." *Molecular cell* 4(5): 815–26.
- Lagouge, Marie, Carmen Argmann, Zachary Gerhart-Hines, Hamid Meziane, Carles Lerin, Frederic Daussin, Nadia Messadeq, Jill Milne, Philip Lambert, Peter Elliott, Bernard Geny, Markku Laakso, Pere Puigserver, and Johan Auwerx. 2006. "Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1alpha." *Cell* 127(6): 1109–22.
- Lambeth, J David, and Andrew S Neish. 2014. "Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited." *Annual review of pathology* 9: 119–45.
- Landes, T, I Leroy, A Bertholet, A Diot, F Khosrobakhsh, M Daloyau, N Davezac, M C Miquel, D Courilleau, E Guillou, A Olichon, G Lenaers, L Arnaune-Pelloquin, L J Emorine, and P Belenguer. 2010. "OPA1 (dys)functions." *Semin Cell Dev Biol* 21(6): 593–98.
- Landes, Thomas, Laurent J Emorine, Delphine Courilleau, Manuel Rojo, Pascale Belenguer, and Laetitia Arnauné-Pelloquin. 2010. "The BH3-Only Bnip3 Binds to the Dynamin Opa1 to Promote Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis by Distinct Mechanisms." *EMBO reports* 11(6): 459–65.
- Landes, Thomas, Ingrid Leroy, Ambre Bertholet, Alan Diot, Farnoosh Khosrobakhsh, Marlène Daloyau, Noémie Davezac, Marie-Christine C Miquel, Delphine Courilleau, Emmanuelle Guillou, Aurélien Olichon, Guy Lenaers, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J Emorine, Pascale Belenguer, and L Arnaune-Pelloquin. 2010. "OPA1 (dys)functions." *Seminars in cell & developmental biology* 21(6): 593–98.
- Lane, Nick. 2003. "A Unifying View of Ageing and Disease: The Double-Agent Theory." *Journal of theoretical biology* 225(4): 531–40.
- Lang, B F, M W Gray, and G Burger. 1999. "Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes." *Annual review of genetics* 33: 351–97.

- Larrouy, D, H Vidal, F Andreelli, M Laville, and D Langin. 1999. "Cloning and mRNA Tissue Distribution of Human PPARgamma Coactivator-1." *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity* 23(12): 1327–32.
- Leary, Scot C. 2012. "Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Powerful Diagnostic Tool for the Detection of Assembly Defects in the Enzyme Complexes of Oxidative Phosphorylation." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 837: 195–206.
- Lee, Seungmin, Seon-Yong Jeong, Won-Chung Lim, Sujeong Kim, Yong-Yea Park, Xuejun Sun, Richard J Youle, and Hyeseong Cho. 2007. "Mitochondrial Fission and Fusion Mediators, hFis1 and OPA1, Modulate Cellular Senescence." *The Journal of biological chemistry* 282(31): 22977–83.
- Lee, Y, M Kim, J Han, K H Yeom, S Lee, S H Baek, and V N Kim. 2004. "MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II." *Embo J* 23(20): 4051–60.
- Lee, Yang-ja, Seon-Yong Jeong, Mariusz Karbowski, Carolyn L Smith, and Richard J Youle. 2004. "Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis." *Molecular biology of the cell* 15(11): 5001–11.
- Lefebvre-Legendre, Linnka, Bénédicte Salin, Jacques Schaëffer, Daniel Brèthes, Alain Dautant, Sharon H Ackerman, and Jean-Paul di Rago. 2005. "Failure to Assemble the Alpha 3 Beta 3 Subcomplex of the ATP Synthase Leads to Accumulation of the Alpha and Beta Subunits within Inclusion Bodies and the Loss of Mitochondrial Cristae in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of biological chemistry* 280(18): 18386–92.
- Lefkimmiatis, Konstantinos, Daniela Leronni, and Aldebaran M Hofer. 2013. "The Inner and Outer Compartments of Mitochondria Are Sites of Distinct cAMP/PKA Signaling Dynamics." *The Journal of cell biology* 202(3): 453–62.
- Lehman, J J, P M Barger, A Kovacs, J E Saffitz, D M Medeiros, and D P Kelly. 2000. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Promotes Cardiac Mitochondrial Biogenesis." *The Journal of clinical investigation* 106(7): 847–56.
- Lenaers, Guy, Christian Hamel, Cécile Delettre, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, and Dan Milea. 2012. "Dominant Optic Atrophy." *Orphanet journal of rare diseases* 7: 46.
- Lenaers, Guy, Pascal Reynier, Ghizlane Elachouri, Chadi Soukkaieh, Aurélien Olichon, Pascale Belenguer, Laurent Baricault, Bernard Ducommun, Christian Hamel, and Cécile Delettre. 2009. "OPA1 Functions in Mitochondria and Dysfunctions in Optic Nerve." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10): 1866–74.
- Leverve, X M, and E Fontaine. "Role of Substrates in the Regulation of Mitochondrial Function in Situ." *IUBMB life* 52(3-5): 221–29.
- Li, Bai-Yan, and John H Schild. 2007. "Electrophysiological and Pharmacological Validation of Vagal Afferent Fiber Type of Neurons Enzymatically Isolated from Rat Nodose Ganglia." *Journal of neuroscience methods* 164(1): 75–85.
- Li, L Y, X Luo, and X Wang. 2001. "Endonuclease G Is an Apoptotic DNase When Released from Mitochondria." *Nature* 412(6842): 95–99.
- Li, Suk-Yee, Zhong Jie Fu, and Amy C Y Lo. 2012. "Hypoxia-Induced Oxidative Stress in Ischemic Retinopathy." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 426769.
- Li, Y, T T Huang, E J Carlson, S Melov, P C Ursell, J L Olson, L J Noble, M P Yoshimura, C Berger, P H Chan, D C Wallace, and C J Epstein. 1995. "Dilated Cardiomyopathy and Neonatal Lethality in Mutant Mice Lacking Manganese Superoxide Dismutase." *Nature genetics* 11(4): 376–81.
- Li, Youfen, Marilena D'Aurelio, Jian-Hong Deng, Jeong-Soon Park, Giovanni Manfredi, Peiqing Hu, Jianxin Lu, and Yidong Bai. 2007. "An Assembled Complex IV Maintains the Stability and Activity of Complex I in Mammalian Mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 282(24): 17557–62.
- Liesa, Marc, Bárbara Borda-d'Água, Gema Medina-Gómez, Christopher J Lelliott, José Carlos Paz, Manuel Rojo, Manuel Palacín, Antonio Vidal-Puig, and Antonio Zorzano. 2008. "Mitochondrial Fusion Is Increased by the Nuclear Coactivator PGC-1beta." *PLoS one* 3(10): e3613.
- Ligon, L A, and O Steward. 2000. "Role of Microtubules and Actin Filaments in the Movement of Mitochondria in the Axons and Dendrites of Cultured Hippocampal Neurons." *The Journal of comparative neurology* 427(3): 351–61.
- Liochev, Stefan I. 2013. "Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging." *Free radical biology & medicine* 60: 1–4.
- Liu, R, J S Althaus, B R Ellerbrock, D A Becker, and M E Gurney. 1998. "Enhanced Oxygen Radical Production in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of neurology* 44(5): 763–70.

- Liu, Xingguo, and György Hajnóczky. 2009. "Ca<sup>2+</sup>-Dependent Regulation of Mitochondrial Dynamics by the Miro-Milton Complex." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10): 1972–76.
- Liu, Ye, Jiangang Long, and Jiankang Liu. 2014. "Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: Who Moved My Premise?" *Geriatrics & gerontology international*.
- Liu, Yuanbin, Gary Fiskum, and David Schubert. 2002. "Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain." *Journal of neurochemistry* 80(5): 780–87.
- Liu, Yutao, Silke Schmidt, Xuejun Qin, Jason Gibson, Drew Munro, Janey L Wiggs, Michael a Hauser, and R Rand Allingham. 2007. "No Association between OPA1 Polymorphisms and Primary Open-Angle Glaucoma in Three Different Populations." *Molecular vision* 13(September): 2137–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079692>
- Lodi, Raffaele, Caterina Tonon, Maria Lucia Valentino, Stefano Iotti, Valeria Clementi, Emil Malucelli, Piero Barboni, Lora Longanesi, Simone Schimpf, Bernd Wissinger, Agostino Baruzzi, Bruno Barbiroli, and Valerio Carelli. 2004. "Deficit of in Vivo Mitochondrial ATP Production in OPA1-Related Dominant Optic Atrophy." *Annals of neurology* 56(5): 719–23.
- Van Loo, G, P Schotte, M van Gurp, H Demol, B Hoorelbeke, K Gevaert, I Rodriguez, A Ruiz-Carrillo, J Vandekerckhove, W Declercq, R Beyaert, and P Vandenabeele. 2001. "Endonuclease G: A Mitochondrial Protein Released in Apoptosis and Involved in Caspase-Independent DNA Degradation." *Cell death and differentiation* 8(12): 1136–42.
- Lopert, Pamela, Brian J Day, and Manisha Patel. 2012. "Thioredoxin Reductase Deficiency Potentiates Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Dopaminergic Cells." *PloS one* 7(11): e50683.
- Lukyanov, Konstantin a, and Vsevolod V Belousov. 2014. "Genetically Encoded Fluorescent Redox Sensors." *Biochimica et biophysica acta* 1840(2): 745–56.
- Lynch, R M, K E Fogarty, and F S Fay. 1991. "Modulation of Hexokinase Association with Mitochondria Analyzed with Quantitative Three-Dimensional Confocal Microscopy." *The Journal of cell biology* 112(3): 385–95.
- Magnifico, Sébastien, Laure Saias, Bérangère Deleglise, Eric Duplus, Devrim Kilinc, Marie-Christine Miquel, Jean-Louis Viovy, Bernard Brugg, and Jean-Michel Peyrin. 2013. "NAD<sup>+</sup> Acts on Mitochondrial SirT3 to Prevent Axonal Caspase Activation and Axonal Degeneration." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(12): 4712–22.
- Maher, Pamela, Richard Dargusch, Laszlo Bodai, Paul E Gerard, Judith M Purcell, and J Lawrence Marsh. 2011. "ERK Activation by the Polyphenols Fisetin and Resveratrol Provides Neuroprotection in Multiple Models of Huntington's Disease." *Human molecular genetics* 20(2): 261–70.
- Mailloux, Ryan J, and Mary-Ellen Harper. 2012. "Mitochondrial Proticity and ROS Signaling: Lessons from the Uncoupling Proteins." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23(9): 451–58.
- Malka, Florence, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, and Manuel Rojo. 2005. "Separate Fusion of Outer and Inner Mitochondrial Membranes." *EMBO reports* 6(9): 853–59.
- Mammucari, Cristina, and Rosario Rizzuto. 2010. "Signaling Pathways in Mitochondrial Dysfunction and Aging." *Mechanisms of ageing and development* 131(7-8): 536–43.
- Manfredi, Giovanni, Jin Fu, Joseline Ojaimi, James E Sadlock, Jennifer Q Kwong, John Guy, and Eric A Schon. 2002. "Rescue of a Deficiency in ATP Synthesis by Transfer of MTATP6, a Mitochondrial DNA-Encoded Gene, to the Nucleus." *Nature genetics* 30(4): 394–99.
- Mannella, Carmen A. 2006. "The Relevance of Mitochondrial Membrane Topology to Mitochondrial Function." *Biochimica et biophysica acta* 1762(2): 140–47.
- Maresca, Alessandra, Chiara la Morgia, Leonardo Caporali, Maria Lucia Valentino, and Valerio Carelli. 2013. "The Optic Nerve: A 'Mito-Window' on Mitochondrial Neurodegeneration." *Molecular and cellular neurosciences* 55: 62–76.
- Margineantu, Daciana H, W Gregory Cox, Linda Sundell, Steven W Sherwood, Joseph M Beechem, and Roderick A Capaldi. 2002. "Cell Cycle Dependent Morphology Changes and Associated Mitochondrial DNA Redistribution in Mitochondria of Human Cell Lines." *Mitochondrion* 1(5): 425–35.
- Markesbery, W R, and M A Lovell. "Four-Hydroxynonenal, a Product of Lipid Peroxidation, Is Increased in the Brain in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of aging* 19(1): 33–36.
- Martinelli, Paola, and Elena I Rugarli. 2010. "Emerging Roles of Mitochondrial Proteases in Neurodegeneration." *Biochimica et biophysica acta* 1797(1): 1–10.
- Martinvalet, Denis, Derek M Dykxhoorn, Roger Ferrini, and Judy Lieberman. 2008. "Granzyme A Cleaves a Mitochondrial Complex I Protein to Initiate Caspase-Independent Cell Death." *Cell* 133(4): 681–92.
- Martiny, Virginie Y, and Maria A Miteva. 2013. "Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism." *Journal of molecular biology* 425(21): 3978–92.

- Mashima, Y, Y Hiida, and Y Oguchi. 1992. "Remission of Leber's Hereditary Optic Neuropathy with Idebenone." *Lancet* 340(8815): 368–69.
- Mashima, Y, K Kigasawa, M Wakakura, and Y Oguchi. 2000. "Do Idebenone and Vitamin Therapy Shorten the Time to Achieve Visual Recovery in Leber Hereditary Optic Neuropathy?" *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 20(3): 166–70.
- Mata, I F, O A Ross, J Kachergus, C Huerta, R Ribacoba, G Moris, M Blazquez, L M Guisasola, C Salvador, C Martinez, M Farrer, and V Alvarez. 2006. "LRRK2 Mutations Are a Common Cause of Parkinson's Disease in Spain." *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 13(4): 391–94.
- Matés, J M, and F Sánchez-Jiménez. 1999. "Antioxidant Enzymes and Their Implications in Pathophysiological Processes." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 4: D339–45.
- Mattson, Mark P, and Tim Magnus. 2006. "Ageing and Neuronal Vulnerability." *Nature reviews. Neuroscience* 7(4): 278–94.
- Mayorov, Vladimir I, Angela J Lowrey, Valerie Biousse, Nancy J Newman, Susan D Cline, and Michael D Brown. 2008. "Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *BMC biochemistry* 9: 22.
- McBride, Heidi, and Luca Scorrano. 2013. "Mitochondrial Dynamics and Physiology." *Biochimica et biophysica acta* 1833(1): 148–49.
- McCord, J M, and I Fridovich. 1969a. "Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (hemocuprein)." *The Journal of biological chemistry* 244(22): 6049–55.
- McMahon, Michael, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, and John D Hayes. 2003. "Keap1-Dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-Driven Gene Expression." *The Journal of biological chemistry* 278(24): 21592–600.
- Meeusen, Shelly, Rachel DeVay, Jennifer Block, Ann Cassidy-Stone, Sarah Wayson, J Michael McCaffery, and Jodi Nunnari. 2006. "Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1." *Cell* 127(2): 383–95.
- Meeusen, Shelly, J Michael McCaffery, and Jodi Nunnari. 2004. "Mitochondrial Fusion Intermediates Revealed in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 305(5691): 1747–52.
- Melov, S. 2000. "Mitochondrial Oxidative Stress. Physiologic Consequences and Potential for a Role in Aging." *Annals of the New York Academy of Sciences* 908: 219–25.
- Melov, S, J Ravenscroft, S Malik, M S Gill, D W Walker, P E Clayton, D C Wallace, B Malfroy, S R Doctrow, and G J Lithgow. 2000. "Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/catalase Mimetics." *Science (New York, N.Y.)* 289(5484): 1567–69.
- Merkwirth, Carsten, and Thomas Langer. 2008. "Mitofusin 2 Builds a Bridge between ER and Mitochondria." *Cell* 135(7): 1165–67.
- . 2009. "Prohibitin Function within Mitochondria: Essential Roles for Cell Proliferation and Cristae Morphogenesis." *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 27–32.
- Merkwirth, Carsten, Paola Martinelli, Anne Korwitz, Michela Morbin, Hella S Brönneke, Sabine D Jordan, Elena I Rugarli, and Thomas Langer. 2012. "Loss of Prohibitin Membrane Scaffolds Impairs Mitochondrial Architecture and Leads to Tau Hyperphosphorylation and Neurodegeneration." *PLoS genetics* 8(11): e1003021.
- Messerschmitt, Marlies, Stefan Jakobs, Frank Vogel, Stefan Fritz, Kai Stefan Dimmer, Walter Neupert, and Benedikt Westermann. 2003. "The Inner Membrane Protein Mdm33 Controls Mitochondrial Morphology in Yeast." *The Journal of cell biology* 160(4): 553–64.
- Midzak, Andrew, Malena Rone, Yassaman Aghazadeh, Martine Culty, and Vassilios Papadopoulos. 2011. "Mitochondrial Protein Import and the Genesis of Steroidogenic Mitochondria." *Molecular and cellular endocrinology* 336(1-2): 70–79.
- Milani, Pamela, Giulia Ambrosi, Omar Gammoh, Fabio Blandini, and Cristina Cereda. 2013. "SOD1 and DJ-1 Converge at Nrf2 Pathway: A Clue for Antioxidant Therapeutic Potential in Neurodegeneration." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 836760.
- Min, Kyoung-jin, Jung Tae Lee, Eun-hye Joe, and Taeg Kyu Kwon. 2011. "An IκBα Phosphorylation Inhibitor Induces Heme Oxygenase-1(HO-1) Expression through the Activation of Reactive Oxygen Species (ROS)-Nrf2-ARE Signaling and ROS-P13K/Akt Signaling in an NF-κB-Independent Mechanism." *Cellular signalling* 23(9): 1505–13.
- Misaka, Takumi, Tomoyuki Miyashita, and Yoshihiro Kubo. 2002. "Primary Structure of a Dynamin-Related Mouse Mitochondrial GTPase and Its Distribution in Brain, Subcellular Localization, and Effect on Mitochondrial Morphology." *The Journal of biological chemistry* 277(18): 15834–42.

- Mishra, Prashant, Valerio Carelli, Giovanni Manfredi, and David C. Chan. 2014. "Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation." *Cell Metabolism* 19(4): 630–41.
- Moncada, Salvador, and Juan P Bolaños. 2006. "Nitric Oxide, Cell Bioenergetics and Neurodegeneration." *Journal of neurochemistry* 97(6): 1676–89.
- Mootha, Vamsi K, Christoph Handschin, Dan Arlow, Xiaohui Xie, Julie St Pierre, Smita Sihag, Wenli Yang, David Altshuler, Pere Puigserver, Nick Patterson, Patricia J Willy, Ira G Schulman, Richard A Heyman, Eric S Lander, and Bruce M Spiegelman. 2004. "Erralpha and Gabpa/b Specify PGC-1alpha-Dependent Oxidative Phosphorylation Gene Expression That Is Altered in Diabetic Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(17): 6570–75.
- Mootha, Vamsi K, Cecilia M Lindgren, Karl-Fredrik Eriksson, Aravind Subramanian, Smita Sihag, Joseph Lehar, Pere Puigserver, Emma Carlsson, Martin Ridderstråle, Esa Laurila, Nicholas Houstis, Mark J Daly, Nick Patterson, Jill P Mesirov, Todd R Golub, Pablo Tamayo, Bruce Spiegelman, Eric S Lander, Joel N Hirschhorn, David Altshuler, and Leif C Groop. 2003. "PGC-1alpha-Responsive Genes Involved in Oxidative Phosphorylation Are Coordinately Downregulated in Human Diabetes." *Nature genetics* 34(3): 267–73.
- Moreno-Lastres, David, Flavia Fontanesi, Inés García-Consuegra, Miguel A Martín, Joaquín Arenas, Antoni Barrientos, and Cristina Ugalde. 2012. "Mitochondrial Complex I Plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly." *Cell metabolism* 15(3): 324–35.
- Müftüoğlu, Meltem, Bülent Elibil, Ozlem Dalmizrak, Ayse Ercan, Gülnihal Kulaksiz, Hamdi Ogüs, Turgay Dalkara, and Nazmi Ozer. 2004. "Mitochondrial Complex I and IV Activities in Leukocytes from Patients with Parkin Mutations." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19(5): 544–48.
- Muftuoglu, Meltem, Mateus P Mori, and Nadja C de Souza-Pinto. 2014. "Formation and Repair of Oxidative Damage in the Mitochondrial DNA." *Mitochondrion*.
- Murray, James, Steven W Taylor, Bing Zhang, Soumitra S Ghosh, and Roderick A Capaldi. 2003. "Oxidative Damage to Mitochondrial Complex I due to Peroxynitrite: Identification of Reactive Tyrosines by Mass Spectrometry." *The Journal of biological chemistry* 278(39): 37223–30.
- Muster, Britta, Wladislaw Kohl, Ilka Wittig, Valentina Strecker, Friederike Joos, Winfried Haase, Jürgen Bereiter-Hahn, and Karin Busch. 2010. "Respiratory Chain Complexes in Dynamic Mitochondria Display a Patchy Distribution in Life Cells." *PloS one* 5(7): e11910.
- Nakai, Atsuko, Osamu Yamaguchi, Toshihiro Takeda, Yoshiharu Higuchi, Shungo Hikoso, Masayuki Taniike, Shigemiki Omiya, Isamu Mizote, Yasushi Matsumura, Michio Asahi, Kazuhiko Nishida, Masatsugu Hori, Noboru Mizushima, and Kinya Otsu. 2007. "The Role of Autophagy in Cardiomyocytes in the Basal State and in Response to Hemodynamic Stress." *Nature medicine* 13(5): 619–24.
- Nakamura, Nobuhiro, Yasuo Kimura, Masaki Tokuda, Shinji Honda, and Shigehisa Hirose. 2006. "MARCH-V Is a Novel Mitofusin 2- and Drp1-Binding Protein Able to Change Mitochondrial Morphology." *EMBO reports* 7(10): 1019–22.
- Nakano, Masahiro, Hiromi Imamura, Takeharu Nagai, and Hiroyuki Noji. 2011. "Ca<sup>2+</sup> Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis Visualized at the Single Cell Level." *ACS chemical biology* 6(7): 709–15.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, and Richard J Youle. 2008. "Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy." *The Journal of cell biology* 183(5): 795–803.
- Navarro, Ana, and Alberto Boveris. "Mitochondrial Nitric Oxide Synthase, Mitochondrial Brain Dysfunction in Aging, and Mitochondria-Targeted Antioxidants." *Advanced drug delivery reviews* 60(13-14): 1534–44.
- Navarro-Yepes, Juliana, Michaela Burns, Annadurai Anandhan, Oleh Khalimonchuk, Luz Maria Del Razo, Betzabet Quintanilla-Vega, Aglaia Pappa, Mihalis I Panayiotidis, and Rodrigo Franco. 2014. "Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival." *Antioxidants & redox signaling*.
- Nègre-Salvayre, A, C Hirtz, G Carrera, R Cazenave, M Trolly, R Salvayre, L Pénicaud, and L Casteilla. 1997. "A Role for Uncoupling Protein-2 as a Regulator of Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(10): 809–15.
- Neupert, W. 1997. "Protein Import into Mitochondria." *Annu Rev Biochem* 66: 863–917.
- Neupert, Walter, and Johannes M Herrmann. 2007. "Translocation of Proteins into Mitochondria." *Annual review of biochemistry* 76: 723–49.
- Newman, Nancy J. 2011. "Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy." *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 9): 2447–50.

- Nguyen, D, M V Alavi, K-Y Kim, T Kang, R T Scott, Y H Noh, J D Lindsey, B Wissinger, M H Ellisman, R N Weinreb, G a Perkins, and W-K Ju. 2011. "A New Vicious Cycle Involving Glutamate Excitotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dynamics." *Cell death & disease* 2: e240.
- Niemann, Axel, Marcel Ruegg, Veronica La Padula, Angelo Schenone, and Ueli Suter. 2005. "Ganglioside-Induced Differentiation Associated Protein 1 Is a Regulator of the Mitochondrial Network: New Implications for Charcot-Marie-Tooth Disease." *The Journal of cell biology* 170(7): 1067–78.
- Niescier, Robert F, Karen T Chang, and Kyung-Tai Min. 2013. "Miro, MCU, and Calcium: Bridging Our Understanding of Mitochondrial Movement in Axons." *Frontiers in cellular neuroscience* 7: 148.
- Nishikawa, T, D Edelstein, X L Du, S Yamagishi, T Matsumura, Y Kaneda, M A Yorek, D Beebe, P J Oates, H P Hammes, I Giardino, and M Brownlee. 2000. "Normalizing Mitochondrial Superoxide Production Blocks Three Pathways of Hyperglycaemic Damage." *Nature* 404(6779): 787–90.
- Norton, Matthew, Andy Cheuk-Him Ng, Stephen Baird, Ariane Dumoulin, Timothy Shutt, Nancy Mah, Miguel a Andrade-Navarro, Heidi M McBride, and Robert a Screaton. 2014. "ROMO1 Is an Essential Redox-Dependent Regulator of Mitochondrial Dynamics." *Science signaling* 7(310): ra10.
- Novotny, E J, G Singh, D C Wallace, L J Dorfman, A Louis, R L Sogg, and L Steinman. 1986. "Leber's Disease and Dystonia: A Mitochondrial Disease." *Neurology* 36(8): 1053–60.
- Nunes-Nesi, Adriano, Wagner L Araújo, Toshihiro Obata, and Alisdair R Fernie. 2013. "Regulation of the Mitochondrial Tricarboxylic Acid Cycle." *Current opinion in plant biology* 16(3): 335–43.
- Olichon, A, L Baricault, N Gas, E Guillou, A Valette, P Belenguer, and G Lenaers. 2003. "Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis." *J Biol Chem* 278(10): 7743–46.
- Olichon, A, E Guillou, C Delettre, T Landes, L Arnaune-Pelloquin, L J Emorine, V Mils, M Daloyau, C Hamel, P Amati-Bonneau, D Bonneau, P Reynier, G Lenaers, and P Belenguer. 2006. "Mitochondrial Dynamics and Disease, OPA1." *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 500–509.
- Olichon, A, T Landes, L Arnaune-Pelloquin, L J Emorine, V Mils, A Guichet, C Delettre, C Hamel, P Amati-Bonneau, D Bonneau, P Reynier, G Lenaers, and P Belenguer. 2007. "Effects of OPA1 Mutations on Mitochondrial Morphology and Apoptosis: Relevance to ADOA Pathogenesis." *J Cell Physiol* 211(2): 423–30.
- Olichon, Aurélien, Laurent Baricault, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Annie Valette, Pascale Belenguer, and Guy Lenaers. 2003. "Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis." *The Journal of biological chemistry* 278(10): 7743–46.
- Olichon, Aurélien, Laurent J Emorine, Eric Descoins, Laetitia Pelloquin, Laetitia Brichese, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Annie Valette, Christian P Hamel, Bernard Ducommun, Guy Lenaers, and Pascale Belenguer. 2002. "The Human Dynamin-Related Protein OPA1 Is Anchored to the Mitochondrial Inner Membrane Facing the Inter-Membrane Space." *FEBS letters* 523(1-3): 171–76.
- Olichon, Aurélien, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Thomas Landes, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J Emorine, Valérie Mils, Marlène Daloyau, Christian Hamel, Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, Guy Lenaers, Pascale Belenguer, and L Arnaune-Pelloquin. 2006. "Mitochondrial Dynamics and Disease, OPA1." *Biochimica et biophysica acta* 1763(5-6): 500–509.
- Orr, Adam L, Shihua Li, Chuan-En Wang, He Li, Jianjun Wang, Juan Rong, Xingshun Xu, Pier Giorgio Mastroberardino, J Timothy Greenamyre, and Xiao-Jiang Li. 2008. "N-Terminal Mutant Huntingtin Associates with Mitochondria and Impairs Mitochondrial Trafficking." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(11): 2783–92.
- Otera, Hidenori, Naotada Ishihara, and Katsuyoshi Mihara. 2013. "New Insights into the Function and Regulation of Mitochondrial Fission." *Biochimica et biophysica acta* 1833(5): 1256–68.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J Youle, and Katsuyoshi Mihara. 2010. "Mff Is an Essential Factor for Mitochondrial Recruitment of Drp1 during Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *The Journal of cell biology* 191(6): 1141–58.
- Ott, Christine, Katharina Ross, Sebastian Straub, Bernd Thiede, Monika Götz, Christian Goosmann, Markus Krischke, Martin J Mueller, Georg Krohne, Thomas Rudel, and Vera Kozjak-Pavlovic. 2012. "Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes." *Molecular and cellular biology* 32(6): 1173–88.
- Owczarek-Lipska, Marta, Philippe Plattet, Ljerka Zipperle, Cord Drögemüller, Horst Posthaus, Gaudenz Dolf, and Martin H Braunschweig. 2011. "A Nonsense Mutation in the Optic Atrophy 3 Gene (OPA3) Causes Dilated Cardiomyopathy in Red Holstein Cattle." *Genomics* 97(1): 51–57.



- Packer, L, E H Witt, and H J Tritschler. 1995. "Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant." *Free radical biology & medicine* 19(2): 227–50.
- Paclet, M H, S Berthier, L Kuhn, J Garin, and F Morel. 2007. "Regulation of Phagocyte NADPH Oxidase Activity: Identification of Two Cytochrome b558 Activation States." *Faseb J* 21(4): 1244–55.
- Pagliarini, David J, and Jack E Dixon. 2006. "Mitochondrial Modulation: Reversible Phosphorylation Takes Center Stage?" *Trends in biochemical sciences* 31(1): 26–34.
- Palacino, James J, Dijana Sagi, Matthew S Goldberg, Stefan Krauss, Claudia Motz, Maik Wacker, Joachim Klose, and Jie Shen. 2004. "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Parkin-Deficient Mice." *The Journal of biological chemistry* 279(18): 18614–22.
- PALADE, G E. 1953. "An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1(4): 188–211.
- Palikaras, Konstantinos, and Nektarios Tavernarakis. 2014. "Mitochondrial Homeostasis: The Interplay between Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis." *Experimental gerontology*.
- De Palma, C, S Falcone, S Pisoni, S Cipolat, C Panzeri, S Pambianco, A Pisconti, R Allevi, M T Bassi, G Cossu, T Pozzan, S Moncada, L Scorrano, S Brunelli, and E Clementi. 2010. "Nitric Oxide Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Is Critical for Myogenic Differentiation." *Cell death and differentiation* 17(11): 1684–96.
- Palmer, Catherine S, Laura D Osellame, David Laine, Olga S Koutsopoulos, Ann E Frazier, and Michael T Ryan. 2011. "MiD49 and MiD51, New Components of the Mitochondrial Fission Machinery." *EMBO reports* 12(6): 565–73.
- Palsson-McDermott, Eva M, and Luke A J O'Neill. 2013. "The Warburg Effect Then and Now: From Cancer to Inflammatory Diseases." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35(11): 965–73.
- Papa, S, F Zanotti, and A Gaballo. 2000. "The Structural and Functional Connection between the Catalytic and Proton Translocating Sectors of the Mitochondrial F1F0-ATP Synthase." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32(4): 401–11.
- Papa, Sergio, Michele Lorusso, and Marco Di Paola. "Cooperativity and Flexibility of the Protonmotive Activity of Mitochondrial Respiratory Chain." *Biochimica et biophysica acta* 1757(5-6): 428–36.
- Papa, Sergio, Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaballo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, and Vittoria Petruzzella. 2012. "The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria." *Advances in experimental medicine and biology* 942: 3–37.
- Parone, Philippe A, Sandrine Da Cruz, Daniel Tondera, Yves Mattenberger, Dominic I James, Pierre Maechler, François Barja, and Jean-Claude Martinou. 2008. "Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA." *PloS one* 3(9): e3257.
- Patti, Mary Elizabeth, Atul J Butte, Sarah Crunkhorn, Kenneth Cusi, Rachele Berria, Sangeeta Kashyap, Yoshinori Miyazaki, Isaac Kohane, Maura Costello, Robert Saccone, Edwin J Landaker, Allison B Goldfine, Edward Mun, Ralph DeFronzo, Jean Finlayson, C Ronald Kahn, and Lawrence J Mandarino. 2003. "Coordinated Reduction of Genes of Oxidative Metabolism in Humans with Insulin Resistance and Diabetes: Potential Role of PGC1 and NRF1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8466–71.
- Paumard, Patrick, Jacques Vaillier, Bénédicte Couлары, Jacques Schaeffer, Vincent Soubannier, David M Mueller, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, and Jean Velours. 2002. "The ATP Synthase Is Involved in Generating Mitochondrial Cristae Morphology." *The EMBO journal* 21(3): 221–30.
- Pedrola, Laia, Antonio Espert, Xingyao Wu, Reyes Claramunt, Michael E Shy, and Francesc Palau. 2005. "GDAP1, the Protein Causing Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4A, Is Expressed in Neurons and Is Associated with Mitochondria." *Human molecular genetics* 14(8): 1087–94.
- Pedros, I, Petrov, D, Allgaier, M, Sureda, F, Barroso, E, Beas-Zarate, C, Auldell, C, Pallas, M, Vazquez-Carrera, M, Casadesus G, Folch, J and Caminis, A. 2014. "Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPSwe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease". *Biochim Biophys Acta* S0925-4439(14)00153-7.
- Pelloquin, L, P Belenguer, Y Menon, and B Ducommun. 1998. "Identification of a Fission Yeast Dynamin-Related Protein Involved in Mitochondrial DNA Maintenance." *Biochem Biophys Res Commun* 251(3): 720–26.
- Pelloquin, L, P Belenguer, Y Menon, N Gas, and B Ducommun. 1999. "Fission Yeast Msp1 Is a Mitochondrial Dynamin Related Protein." *J. Cell Science* 112: 4151–61.
- Perkins, Guy, Ella Bossy-Wetzel, and Mark H Ellisman. 2009. "New Insights into Mitochondrial Structure during Cell Death." *Experimental neurology* 218(2): 183–92.

- Pesch, U E, B Leo-Kottler, S Mayer, B Jurklies, U Kellner, E Apfelstedt-Sylla, E Zrenner, C Alexander, and B Wissinger. 2001. "OPA1 Mutations in Patients with Autosomal Dominant Optic Atrophy and Evidence for Semi-Dominant Inheritance." *Human molecular genetics* 10(13): 1359–68.
- Pich, S, D Bach, P Briones, M Liesa, M Camps, X Testar, M Palacin, and A Zorzano. 2005. "The Charcot-Marie-Tooth Type 2A Gene Product, Mfn2, up-Regulates Fuel Oxidation through Expression of OXPHOS System." *Hum Mol Genet* 14(11): 1405–15.
- Pilger, A, and H W Rüdiger. 2006. "8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine as a Marker of Oxidative DNA Damage Related to Occupational and Environmental Exposures." *International archives of occupational and environmental health* 80(1): 1–15.
- Piquereau, Jerome, Fanny Caffin, Marta Novotova, Alexandre Prola, Anne Garnier, Philippe Mateo, Dominique Fortin, Le Ha Huynh, Valérie Nicolas, Marcel V Alavi, Catherine Brenner, Renée Ventura-Clapier, Vladimir Veksler, and Frédéric Joubert. 2012. "Down-Regulation of OPA1 Alters Mouse Mitochondrial Morphology, PTP Function, and Cardiac Adaptation to Pressure Overload." *Cardiovascular research* 94(3): 408–17.
- Poliquin, Pierre O, Jinghui Chen, Mathieu Cloutier, Louis-Éric Trudeau, and Mario Jolicoeur. 2013. "Metabolomics and in-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease." *PLoS one* 8(7): e69146.
- Polster, Brian M. 2013. "AIF, Reactive Oxygen Species, and Neurodegeneration: A 'Complex' Problem." *Neurochemistry international* 62(5): 695–702.
- Popa-Wagner, Aurel, Smaranda Mitran, Senthilkumar Sivanesan, Edwin Chang, and Ana-Maria Buga. 2013. "ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013(Figure 1): 963520.
- Popov, Victor, Nikolai I Medvedev, Heather A Davies, and Michael G Stewart. 2005. "Mitochondria Form a Filamentous Reticular Network in Hippocampal Dendrites but Are Present as Discrete Bodies in Axons: A Three-Dimensional Ultrastructural Study." *The Journal of comparative neurology* 492(1): 50–65.
- Porntadavity, S, Y Xu, K Kinningham, V M Rangnekar, V Prachayasittikul, V Prachayasitikul, and D K St Clair. 2001. "TPA-Activated Transcription of the Human MnSOD Gene: Role of Transcription Factors Sp-1 and Egr-1." *DNA and cell biology* 20(8): 473–81.
- Powell, Brenda L, Carmel Toomes, Shiela Scott, Anna Yeung, Nicola J Marchbank, Paul G D Spry, Rosemary Lumb, Christopher F Inglehearn, and Amanda J Churchill. 2003. "Polymorphisms in OPA1 Are Associated with Normal Tension Glaucoma." *Molecular vision* 9: 460–64.
- Praefcke, G J, and H T McMahon. 2004. "The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 133–47.
- Prasad, Sashank, and Steven L Galetta. 2011. "Anatomy and Physiology of the Afferent Visual System." *Handbook of clinical neurology* 102: 3–19.
- Prester, T, P Talalay, J Alam, Y I Ahn, P J Lee, and A M Choi. 1995. "Parallel Induction of Heme Oxygenase-1 and Chemoprotective Phase 2 Enzymes by Electrophiles and Antioxidants: Regulation by Upstream Antioxidant-Responsive Elements (ARE)." *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 1(7): 827–37.
- Prozorovski, Timour, Ulf Schulze-Topphoff, Robert Glumm, Jan Baumgart, Friederike Schröter, Olaf Ninnemann, Elise Siegert, Ivo Bendix, Oliver Brüstle, Robert Nitsch, Frauke Zipp, and Orhan Aktas. 2008. "Sirt1 Contributes Critically to the Redox-Dependent Fate of Neural Progenitors." *Nature cell biology* 10(4): 385–94.
- Puigserver, P, Z Wu, C W Park, R Graves, M Wright, and B M Spiegelman. 1998. "A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis." *Cell* 92(6): 829–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529258> (May 6, 2014).
- PULLMAN, M E, and G C MONROY. 1963. "A NATURALLY OCCURRING INHIBITOR OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE." *The Journal of biological chemistry* 238: 3762–69.
- Puomila, Anu, Kirsi Huoponen, Maija Mäntyjärvi, Petra Hämäläinen, Reetta Paananen, Eeva-Marja Sankila, Marja-Liisa Savontaus, Mirja Somer, and Eeva Nikoskelainen. 2005. "Dominant Optic Atrophy: Correlation between Clinical and Molecular Genetic Studies." *Acta ophthalmologica Scandinavica* 83(3): 337–46.
- Qi, Xiaoping, Alfred S Lewin, Liang Sun, William W Hauswirth, and John Guy. 2004. "SOD2 Gene Transfer Protects against Optic Neuropathy Induced by Deficiency of Complex I." *Annals of neurology* 56(2): 182–91.
- Qi, Xiaoping, Liang Sun, William W Hauswirth, Alfred S Lewin, and John Guy. 2007. "Use of Mitochondrial Antioxidant Defenses for Rescue of Cells with a Leber Hereditary Optic Neuropathy-Causing Mutation." *Archives of ophthalmology* 125(2): 268–72.
- Quirós, Pedro M, Andrew J Ramsay, David Sala, Erika Fernández-Vizarra, Francisco Rodríguez, Juan R Peinado, Maria Soledad Fernández-García, José A Vega, José A Enríquez, Antonio Zorzano, and Carlos López-Otín. 2012. "Loss of

- Mitochondrial Protease OMA1 Alters Processing of the GTPase OPA1 and Causes Obesity and Defective Thermogenesis in Mice." *The EMBO journal* 31(9): 2117–33.
- Rahn, Jennifer J, Krista D Stackley, and Sherine S L Chan. 2013. "Opa1 Is Required for Proper Mitochondrial Metabolism in Early Development." *PloS one* 8(3): e59218.
- Rapaport, D, M Brunner, W Neupert, and B Westermann. 1998. "Fzo1p Is a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for the Biogenesis of Functional Mitochondria in *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Biol Chem* 273(32): 20150–55.
- Ray, Paul D, Bo-Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. 2012. "Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling." *Cellular signalling* 24(5): 981–90.
- Regenold, W T, M Pratt, S Nekkallapu, P S Shapiro, T Kristian, and G Fiskum. 2012. "Mitochondrial Detachment of Hexokinase 1 in Mood and Psychotic Disorders: Implications for Brain Energy Metabolism and Neurotrophic Signaling." *Journal of psychiatric research* 46(1): 95–104.
- Renault, Hugues, Jean-Etienne Bassard, Björn Hamberger, and Danièle Werck-Reichhart. 2014. "Cytochrome P450-Mediated Metabolic Engineering: Current Progress and Future Challenges." *Current opinion in plant biology* 19C: 27–34.
- Reynier, P, P Amati-Bonneau, C Verny, A Olichon, G Simard, A Guichet, C Bonnemains, F Malecaze, M C Malinge, J B Pelletier, P Calvas, H Dollfus, P Belenguer, Y Malthiery, G Lenaers, and D Bonneau. 2004. "OPA3 Gene Mutations Responsible for Autosomal Dominant Optic Atrophy and Cataract." *J Med Genet* 41(9): e110.
- Rhein, Virginie, Xiaomin Song, Andreas Wiesner, Lars M Ittner, Ginette Baysang, Fides Meier, Laurence Ozmen, Horst Bluethmann, Stefan Dröse, Ulrich Brandt, Egemen Savaskan, Christian Czech, Jürgen Götz, and Anne Eckert. 2009. "Amyloid-Beta and Tau Synergistically Impair the Oxidative Phosphorylation System in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47): 20057–62.
- Ricci, Jean-Ehrland, Cristina Muñoz-Pinedo, Patrick Fitzgerald, Béatrice Bailly-Maitre, Guy A Perkins, Nagendra Yadava, Immo E Scheffler, Mark H Ellisman, and Douglas R Green. 2004. "Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain." *Cell* 117(6): 773–86.
- Riedl, Stefan J, and Guy S Salvesen. 2007. "The Apoptosome: Signalling Platform of Cell Death." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(5): 405–13.
- Rizvi, Saliha, Syed T Raza, Faizal Ahmed, Absar Ahmad, Shania Abbas, and Farzana Mahdi. 2014. "The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases." *Sultan Qaboos University medical journal* 14(2): e157–e165.
- Roberts, L J, and J D Morrow. 2000. "Measurement of F(2)-Isoprostanes as an Index of Oxidative Stress in Vivo." *Free radical biology & medicine* 28(4): 505–13.
- Robinson, B H, X P Luo, S Pitkänen, S Bratinova, J Bourgeois, D C Lehotay, and S Raha. 1998. "Diagnosis of Mitochondrial Energy Metabolism Defects in Tissue Culture. Induction of MnSOD and Bcl-2 in Mitochondria from Patients with Complex I (NADH-CoQ Reductase) Deficiency." *BioFactors (Oxford, England)* 7(3): 229–30.
- Rodenburg, Richard J T. 2011. "Biochemical Diagnosis of Mitochondrial Disorders." *Journal of inherited metabolic disease* 34(2): 283–92.
- Rodgers, Joseph T, Carlos Lerin, Wilhelm Haas, Steven P Gygi, Bruce M Spiegelman, and Pere Puigserver. 2005. "Nutrient Control of Glucose Homeostasis through a Complex of PGC-1alpha and SIRT1." *Nature* 434(7029): 113–18.
- Rojo, Manuel, Frédéric Legros, Danielle Chateau, and Anne Lombès. 2002. "Membrane Topology and Mitochondrial Targeting of Mitofusins, Ubiquitous Mammalian Homologs of the Transmembrane GTPase Fzo." *Journal of cell science* 115(Pt 8): 1663–74.
- Rosano, Camillo. 2011. "Molecular Model of Hexokinase Binding to the Outer Mitochondrial Membrane Porin (VDAC1): Implication for the Design of New Cancer Therapies." *Mitochondrion* 11(3): 513–19.
- Rossignol, Rodrigue, Robert Gilkerson, Robert Aggeler, Kunihiro Yamagata, S James Remington, and Roderick A Capaldi. 2004. "Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells." *Cancer research* 64(3): 985–93.
- Russell, Aaron P, Emmanuel Somm, Manu Praz, Antoinette Crettenand, Oliver Hartley, Astrid Melotti, Jean-Paul Giacobino, Patrick Muzzin, Charles Gobelet, and Olivier Dériaz. 2003. "UCP3 Protein Regulation in Human Skeletal Muscle Fibre Types I, IIa and IIx Is Dependent on Exercise Intensity." *The Journal of physiology* 550(Pt 3): 855–61.
- Sabet-Peyman, Esfandiar J, Khizer R Khaderi, and Alfredo A Sadun. 2012. "Is Leber Hereditary Optic Neuropathy Treatable? Encouraging Results with Idebenone in Both Prospective and Retrospective Trials and an Illustrative Case." *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 32(1): 54–57.

- Sadun, A A, and C J Bassi. 1990. "Optic Nerve Damage in Alzheimer's Disease." *Ophthalmology* 97(1): 9–17.
- Sadun, Alfredo A, Chiara La Morgia, and Valerio Carelli. 2014. "Mitochondrial Optic Neuropathies: Additional Facts and Concepts - Response." *Clinical & experimental ophthalmology* 42(2): 207–8.
- Salazar, María, Ana I Rojo, Diego Velasco, Rosa María de Sagarra, and Antonio Cuadrado. 2006. "Glycogen Synthase Kinase-3beta Inhibits the Xenobiotic and Antioxidant Cell Response by Direct Phosphorylation and Nuclear Exclusion of the Transcription Factor Nrf2." *The Journal of biological chemistry* 281(21): 14841–51.
- Samant, Sadhana a, Hannah J Zhang, Zhigang Hong, Vinodkumar B Pillai, Nagalingam R Sundaresan, Donald Wolfgeher, Stephen L Archer, David C Chan, and Mahesh P Gupta. 2014. "SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 To Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress." *Molecular and cellular biology* 34(5): 807–19.
- Santel, A, and M T Fuller. 2001. "Control of Mitochondrial Morphology by a Human Mitofusin." *Journal of cell science* 114(Pt 5): 867–74.
- Santel, Ansgar, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler, Richard J Youle, and Margaret T Fuller. 2003. "Mitofusin-1 Protein Is a Generally Expressed Mediator of Mitochondrial Fusion in Mammalian Cells." *Journal of cell science* 116(Pt 13): 2763–74.
- Sarzi, Emmanuelle, Claire Angebault, Marie Seveno, Naïg Gueguen, Benjamin Chaix, Guy Bielicki, Nathalie Boddaert, Anne-Laure Mausset-Bonnefont, Chantal Cazevieuille, Valérie Rigau, Jean-Pierre Renou, Jing Wang, Cécile Delettre, Philippe Brabet, Jean-Luc Puel, Christian P Hamel, Pascal Reynier, and Guy Lenaers. 2012. "The Human OPA1delTTAG Mutation Induces Premature Age-Related Systemic Neurodegeneration in Mouse." *Brain : a journal of neurology* 135(Pt 12): 3599–3613.
- Sastre, Juan, Federico V Pallardó, and José Viña. 2003. "The Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Aging." *Free radical biology & medicine* 35(1): 1–8.
- Sato, Shin-ichi, Asako Murata, Tsubasa Orihara, Takashi Shirakawa, Kiyotake Suenaga, Hideo Kigoshi, and Motonari Uesugi. 2011. "Marine Natural Product Aurilide Activates the OPA1-Mediated Apoptosis by Binding to Prohibitin." *Chemistry & biology* 18(1): 131–39.
- Satoh, Masaaki, Toshiro Hamamoto, Norimasa Seo, Yasuo Kagawa, and Hitoshi Endo. 2003. "Differential Sublocalization of the Dynamin-Related Protein OPA1 Isoforms in Mitochondria." *Biochemical and biophysical research communications* 300(2): 482–93.
- Sazanov, Leonid A, Rozbeh Baradaran, Rouslan G Efremov, John M Berrisford, and Gurdeep Minhas. 2013. "A Long Road towards the Structure of Respiratory Complex I, a Giant Molecular Proton Pump." *Biochemical Society transactions* 41(5): 1265–71.
- Scarpulla, Richard C. 2008. "Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function." *Physiological reviews* 88(2): 611–38.
- Schäfer, Eva, Holger Seelert, Nicole H Reifschneider, Frank Krause, Norbert A Dencher, and Janet Vonck. 2006. "Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes." *The Journal of biological chemistry* 281(22): 15370–75.
- Schägger, H, and K Pfeiffer. 2000. "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *The EMBO journal* 19(8): 1777–83.
- . 2001. "The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I-V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes." *The Journal of biological chemistry* 276(41): 37861–67.
- Schapira, A H. 1998. "Human Complex I Defects in Neurodegenerative Diseases." *Biochimica et biophysica acta* 1364(2): 261–70.
- Schapira, Anthony H V. 2012. "Mitochondrial Diseases." *Lancet* 379(9828): 1825–34.
- Schimpf, Simone, Simone Schaich, and Bernd Wissinger. 2006. "Activation of Cryptic Splice Sites Is a Frequent Splicing Defect Mechanism Caused by Mutations in Exon and Intron Sequences of the OPA1 Gene." *Human genetics* 118(6): 767–71.
- Schmidt, Oliver, Nikolaus Pfanner, and Chris Meisinger. 2010. "Mitochondrial Protein Import: From Proteomics to Functional Mechanisms." *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(9): 655–67.
- Schroedl, Clara, David S McClintock, G R Scott Budinger, and Navdeep S Chandel. 2002. "Hypoxic but Not Anoxic Stabilization of HIF-1alpha Requires Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283(5): L922–31.
- Schwarz, Thomas L. 2013. "Mitochondrial Trafficking in Neurons." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(6).

- Scorrano, Luca, Mona Ashiya, Karolyn Buttle, Solly Weiler, Scott A Oakes, Carmen A Mannella, and Stanley J Korsmeyer. 2002. "A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis." *Developmental cell* 2(1): 55–67.
- Sedeek, Mona, Rania Nasrallah, Rhian M Touyz, and Richard L Hébert. 2013. "NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24(10): 1512–18.
- Selivanov, Vitaly A, Tatyana V Votyakova, Violetta N Pivtoraiko, Jennifer Zeak, Tatiana Sukhomlin, Massimo Trucco, Josep Roca, and Marta Cascante. 2011. "Reactive Oxygen Species Production by Forward and Reverse Electron Fluxes in the Mitochondrial Respiratory Chain." *PLoS computational biology* 7(3): e1001115.
- Seo, Hyun-Ae, and In-Kyu Lee. 2013. "The Role of Nrf2: Adipocyte Differentiation, Obesity, and Insulin Resistance." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 184598.
- Sesaki, H, and R E Jensen. 1999. "Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape." *J Cell Biol* 147(4): 699–706.
- Sevrioukova, Irina F. 2011. "Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation." *Antioxidants & redox signaling* 14(12): 2545–79.
- Shabalina, Irina G, and Jan Nedergaard. 2011. "Mitochondrial ('mild') Uncoupling and ROS Production: Physiologically Relevant or Not?" *Biochemical Society transactions* 39(5): 1305–9.
- Shah, Z H, G A Hakkaart, B Arku, L de Jong, H van der Spek, L A Grivell, and H T Jacobs. 2000. "The Human Homologue of the Yeast Mitochondrial AAA Metalloprotease Yme1p Complements a Yeast yme1 Disruptant." *FEBS letters* 478(3): 267–70.
- Shahrestani, Parvin, Hung-Tat Leung, Phung Khanh Le, William L Pak, Stephanie Tse, Karen Ocorr, and Taosheng Huang. 2009. "Heterozygous Mutation of Drosophila Opa1 Causes the Development of Multiple Organ Abnormalities in an Age-Dependent and Organ-Specific Manner." *PloS one* 4(8): e6867.
- Shrader, William D, Akiko Amagata, Adam Barnes, Gregory M Enns, Andrew Hinman, Orion Jankowski, Viktoria Kheifets, Ryo Komatsuzaki, Edgar Lee, Paul Mollard, Katsuyuki Murase, Alfredo A Sadun, Martin Thoolen, Kieron Wesson, and Guy Miller. 2011. "A-Tocotrienol Quinone Modulates Oxidative Stress Response and the Biochemistry of Aging." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21(12): 3693–98.
- Siddiqui, Almas, Sulay Rivera-Sánchez, María del R Castro, Karina Acevedo-Torres, Anand Rane, Carlos A Torres-Ramos, David G Nicholls, Julie K Andersen, and Sylvette Ayala-Torres. 2012. "Mitochondrial DNA Damage Is Associated with Reduced Mitochondrial Bioenergetics in Huntington's Disease." *Free radical biology & medicine* 53(7): 1478–88.
- Sies, Helmut. 2014. "Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress." *The Journal of biological chemistry* 289(13): 8735–41.
- Silva, Robert M, Chia-Yi Kuan, Pasko Rakic, and Robert E Burke. 2005. "Mixed Lineage Kinase-c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway: A New Therapeutic Target in Parkinson's Disease." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20(6): 653–64.
- Skulachev, V P. 1996. "Role of Uncoupled and Non-Coupled Oxidations in Maintenance of Safely Low Levels of Oxygen and Its One-Electron Reductants." *Quarterly reviews of biophysics* 29(2): 169–202.
- Smirnova, E, L Griparic, D L Shurland, and A M van der Bliek. 2001. "Dynammin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells." *Molecular biology of the cell* 12(8): 2245–56.
- Smirnova, E, D L Shurland, E D Newman-Smith, B Pishvae, and A M van der Bliek. 1999. "A Model for Dynammin Self-Assembly Based on Binding between Three Different Protein Domains." *J Biol Chem* 274(21): 14942–47.
- Smirnova, E, D L Shurland, S N Ryazantsev, and A M van der Bliek. 1998. "A Human Dynammin-Related Protein Controls the Distribution of Mitochondria." *J Cell Biol* 143(2): 351–58.
- Smith, R G, Y K Henry, M P Mattson, and S H Appel. 1998. "Presence of 4-Hydroxynonenal in Cerebrospinal Fluid of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Annals of neurology* 44(4): 696–99.
- Sohal, Rajindar S. 2002a. "Oxidative Stress Hypothesis of Aging." *Free radical biology & medicine* 33(5): 573–74.
- . 2002b. "Role of Oxidative Stress and Protein Oxidation in the Aging Process." *Free radical biology & medicine* 33(1): 37–44.
- Sohal, Rajindar S, and William C Orr. 2012. "The Redox Stress Hypothesis of Aging." *Free radical biology & medicine* 52(3): 539–55.
- Song, Zhiyin, Hsiuchen Chen, Maja Fiket, Christiane Alexander, and David C Chan. 2007. "OPA1 Processing Controls Mitochondrial Fusion and Is Regulated by mRNA Splicing, Membrane Potential, and Yme1L." *The Journal of cell biology* 178(5): 749–55.

- Song, Zhiyin, Mariam Ghochani, J Michael McCaffery, Terrence G Frey, and David C Chan. 2009. "Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion." *Molecular biology of the cell* 20(15): 3525–32.
- Soriano, Francesc X, Marc Liesa, Daniel Bach, David C Chan, Manuel Palacín, and Antonio Zorzano. 2006. "Evidence for a Mitochondrial Regulatory Pathway Defined by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1 Alpha, Estrogen-Related Receptor-Alpha, and Mitofusin 2." *Diabetes* 55(6): 1783–91.
- Spinazzi, Marco, Silvia Cazzola, Mario Bortolozzi, Alessandra Baracca, Emanuele Loro, Alberto Casarin, Giancarlo Solaini, Gianluca Sgarbi, Gabriella Casalena, Giovanna Cenacchi, Adriana Malena, Christian Frezza, Franco Carrara, Corrado Angelini, Luca Scorrano, Leonardo Salviati, and Lodovica Vergani. 2008. "A Novel Deletion in the GTPase Domain of OPA1 Causes Defects in Mitochondrial Morphology and Distribution, but Not in Function." *Human molecular genetics* 17(21): 3291–3302.
- Srikanth, K, E Pereira, A C Duarte, and I Ahmad. 2013. "Glutathione and Its Dependent Enzymes' Modulatory Responses to Toxic Metals and Metalloids in Fish—a Review." *Environmental science and pollution research international* 20(4): 2133–49.
- St-Pierre, Julie, Stavit Drori, Marc Uldry, Jessica M Silvaggi, James Rhee, Sibylle Jäger, Christoph Handschin, Kangni Zheng, Jiandie Lin, Wenli Yang, David K Simon, Robert Bachoo, and Bruce M Spiegelman. 2006. "Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators." *Cell* 127(2): 397–408.
- Stewart, Daniel, Erin Killeen, Ryan Naquin, Safdar Alam, and Jawed Alam. 2003. "Degradation of Transcription Factor Nrf2 via the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Stabilization by Cadmium." *The Journal of biological chemistry* 278(4): 2396–2402.
- Stiburek, L, H Hansikova, M Tesarova, L Cerna, and J Zeman. 2006. "Biogenesis of Eukaryotic Cytochrome c Oxidase." *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 55 Suppl 2: S27–41.
- Storch, Alexander, Wolfgang H Jost, Peter Vieregge, Jörg Spiegel, Wolfgang Greulich, Joachim Durner, Thomas Müller, Andreas Kupsch, Henning Henningsen, Wolfgang H Oertel, Gerd Fuchs, Wilfried Kuhn, Petra Niklowitz, Rainer Koch, Birgit Herting, and Heinz Reichmann. 2007. "Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial on Symptomatic Effects of Coenzyme Q(10) in Parkinson Disease." *Archives of neurology* 64(7): 938–44.
- Stuart, J A, S Mayard, K Hashiguchi, N C Souza-Pinto, and V A Bohr. 2005. "Localization of Mitochondrial DNA Base Excision Repair to an Inner Membrane-Associated Particulate Fraction." *Nucleic acids research* 33(12): 3722–32.
- Sugioka, Rie, Shigeomi Shimizu, and Yoshihide Tsujimoto. 2004. "Fzo1, a Protein Involved in Mitochondrial Fusion, Inhibits Apoptosis." *The Journal of biological chemistry* 279(50): 52726–34.
- Susin, S A, H K Lorenzo, N Zamzami, I Marzo, B E Snow, G M Brothers, J Mangion, E Jacotot, P Costantini, M Loeffler, N Larochette, D R Goodlett, R Aebersold, D P Siderovski, J M Penninger, and G Kroemer. 1999. "Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor." *Nature* 397(6718): 441–46.
- Susin, S A, N Zamzami, M Castedo, T Hirsch, P Marchetti, A Macho, E Daugas, M Geuskens, and G Kroemer. 1996. "Bcl-2 Inhibits the Mitochondrial Release of an Apoptogenic Protease." *The Journal of experimental medicine* 184(4): 1331–41.
- Suzukawa, K, K Miura, J Mitsushita, J Resau, K Hirose, R Crystal, and T Kamata. 2000. "Nerve Growth Factor-Induced Neuronal Differentiation Requires Generation of Rac1-Regulated Reactive Oxygen Species." *The Journal of biological chemistry* 275(18): 13175–78.
- Swerdlow, Russell H. 2009. "Mitochondrial Medicine and the Neurodegenerative Mitochondriopathies." *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2(3): 150–67.
- Syktotis, Gerasimos P, and Dirk Bohmann. 2010. "Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease." *Science signaling* 3(112): re3.
- Taguchi, Naoko, Naotada Ishihara, Akihiro Jofuku, Toshihiko Oka, and Katsuyoshi Mihara. 2007. "Mitotic Phosphorylation of Dynamin-Related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission." *The Journal of biological chemistry* 282(15): 11521–29.
- Takai, Hiroyuki, Agata Smogorzewska, and Titia de Lange. 2003. "DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres." *Current biology : CB* 13(17): 1549–56.
- Takaya, Kai, Takafumi Suzuki, Hozumi Motohashi, Ko Onodera, Susumu Satomi, Thomas W Kensler, and Masayuki Yamamoto. 2012. "Validation of the Multiple Sensor Mechanism of the Keap1-Nrf2 System." *Free radical biology & medicine* 53(4): 817–27.
- Tang, Sha, Phung Khanh Le, Stephanie Tse, Douglas C Wallace, and Taosheng Huang. 2009. "Heterozygous Mutation of Opa1 in Drosophila Shortens Lifespan Mediated through Increased Reactive Oxygen Species Production." *PloS one* 4(2): e4492.

- Taylor, Cormac T, and Salvador Moncada. 2010. "Nitric Oxide, Cytochrome C Oxidase, and the Cellular Response to Hypoxia." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30(4): 643–47.
- Tejada-Simon, Maria V, Faridis Serrano, Laura E Villasana, Beatriz I Kanterewicz, Gang-Yi Wu, Mark T Quinn, and Eric Klann. 2005. "Synaptic Localization of a Functional NADPH Oxidase in the Mouse Hippocampus." *Molecular and cellular neurosciences* 29(1): 97–106.
- Territo, P R, V K Mootha, S A French, and R S Balaban. 2000. "Ca(2+) Activation of Heart Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Role of the F(0)/F(1)-ATPase." *American journal of physiology. Cell physiology* 278(2): C423–35.
- Thayer, S A, and R J Miller. 1990. "Regulation of the Intracellular Free Calcium Concentration in Single Rat Dorsal Root Ganglion Neurons in Vitro." *The Journal of physiology* 425: 85–115.
- Thimmulappa, Rajesh K, Kim H Mai, Sorachai Srisuma, Thomas W Kensler, Masayuki Yamamoto, and Shyam Biswal. 2002. "Identification of Nrf2-Regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray." *Cancer research* 62(18): 5196–5203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234984> (May 23, 2014).
- Tokarz, Paulina, Kai Kaarniranta, and Janusz Blasiak. 2013. "Role of Antioxidant Enzymes and Small Molecular Weight Antioxidants in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD)." *Biogerontology* 14(5): 461–82.
- Tondera, Daniel, Frank Czauderna, Katharina Paulick, Rolf Schwarzer, Jörg Kaufmann, and Ansgar Santel. 2005. "The Mitochondrial Protein MTP18 Contributes to Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *Journal of cell science* 118(Pt 14): 3049–59.
- Tondera, Daniel, Stéphanie Grandemange, Alexis Jourdain, Mariusz Karbowski, Yves Mattenberger, Sébastien Herzig, Sandrine Da Cruz, Pascaline Clerc, Ines Raschke, Carsten Merkwirth, Sarah Ehses, Frank Krause, David C Chan, Christiane Alexander, Christoph Bauer, Richard Youle, Thomas Langer, and Jean-Claude Martinou. 2009. "SLP-2 Is Required for Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion." *The EMBO journal* 28(11): 1589–1600.
- Tretter, Laszlo, Emanuela Biagioni Angeli, Mohammad Reza Ardestani, Gianfrancesco Goracci, and Vera Adam-Vizi. 2011. "Reversible Inhibition of Hydrogen Peroxide Elimination by Calcium in Brain Mitochondria." *Journal of neuroscience research* 89(12): 1965–72.
- Tsatmali, Marina, Elisabeth C Walcott, and Kathryn L Crossin. 2005. "Newborn Neurons Acquire High Levels of Reactive Oxygen Species and Increased Mitochondrial Proteins upon Differentiation from Progenitors." *Brain research* 1040(1-2): 137–50.
- Tullet, Jennifer M A, Maren Hertweck, Jae Hyung An, Joseph Baker, Ji Yun Hwang, Shu Liu, Riva P Oliveira, Ralf Baumeister, and T Keith Blackwell. 2008. "Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in C. Elegans." *Cell* 132(6): 1025–38.
- Turrens, J F. 1997. "Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain." *Bioscience reports* 17(1): 3–8.
- Turrens, J F, A Alexandre, and A L Lehninger. 1985. "Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria." *Archives of biochemistry and biophysics* 237(2): 408–14.
- Turrens, J F, and A Boveris. 1980. "Generation of Superoxide Anion by the NADH Dehydrogenase of Bovine Heart Mitochondria." *The Biochemical journal* 191(2): 421–27.
- Turrens, J F, B A Freeman, and J D Crapo. 1982. "Hyperoxia Increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release by Lung Mitochondria and Microsomes." *Archives of biochemistry and biophysics* 217(2): 411–21.
- Turrens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of physiology* 552(Pt 2): 335–44.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J a Molina, Hibo Mohamed, Jakob D Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, Sarah E Haigh, Steve Katz, Guy Las, Joseph Alroy, Min Wu, Bénédicte F Py, Junying Yuan, Jude T Deeney, Barbara E Corkey, and Orian S Shirihai. 2008. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO journal* 27(2): 433–46.
- Ugalde, Cristina, Rutger Vogel, Richard Huijbens, Bert Van Den Heuvel, Jan Smeitink, and Leo Nijtmans. 2004. "Human Mitochondrial Complex I Assembles through the Combination of Evolutionary Conserved Modules: A Framework to Interpret Complex I Deficiencies." *Human molecular genetics* 13(20): 2461–72.
- Uo, Takuma, Jenny Dworzak, Chizuru Kinoshita, Denise M Inman, Yoshito Kinoshita, Philip J Horner, and Richard S Morrison. 2009. "Drp1 Levels Constitutively Regulate Mitochondrial Dynamics and Cell Survival in Cortical Neurons." *Experimental neurology* 218(2): 274–85.
- Valavanidis, Athanasios, Thomais Vlachogianni, and Constantinos Fiotakis. 2009. "8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis." *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 27(2): 120–39.

- Valente, Enza Maria, Patrick M Abou-Sleiman, Viviana Caputo, Miratul M K Muqit, Kirsten Harvey, Suzana Gispert, Zeeshan Ali, Domenico Del Turco, Anna Rita Bentivoglio, Daniel G Healy, Alberto Albanese, Robert Nussbaum, Rafael González-Maldonado, Thomas Deller, Sergio Salvi, Pietro Cortelli, William P Gilks, David S Latchman, Robert J Harvey, Bruno Dallapiccola, Georg Auburger, and Nicholas W Wood. 2004. "Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1." *Science (New York, N.Y.)* 304(5674): 1158–60.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T D Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1): 44–84.
- Varghese, Merina, Wei Zhao, Jun Wang, Alice Cheng, Xianjuan Qian, Amna Chaudhry, Lap Ho, and Giulio Maria Pasinetti. 2011. "Mitochondrial Bioenergetics Is Defective in Presymptomatic Tg2576 AD Mice." *Translational neuroscience* 2(1).
- Vartak, Rasika, Christina Ann-Marie Porras, and Yidong Bai. 2013. "Respiratory Supercomplexes: Structure, Function and Assembly." *Protein & cell* 4(8): 582–90.
- Vaux, David L, and John Silke. 2003. "Mammalian Mitochondrial IAP Binding Proteins." *Biochemical and biophysical research communications* 304(3): 499–504.
- Vehviläinen, Piia, Jari Koistinaho, and Goldsteins Gundars. 2014. "Mechanisms of Mutant SOD1 Induced Mitochondrial Toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Frontiers in cellular neuroscience* 8: 126.
- Venditti, Paola, Lisa Di Stefano, and Sergio Di Meo. 2013. "Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species." *Mitochondrion* 13(2): 71–82.
- Venkataraman, Krishnan, Sandhya Khurana, and T C Tai. 2013. "Oxidative Stress in Aging--Matters of the Heart and Mind." *International journal of molecular sciences* 14(9): 17897–925.
- Vidal-Puig, A J. 2000. "Uncoupling Expectations." *Nature genetics* 26(4): 387–88.
- Viña, Jose, Juan Sastre, Federico Pallardó, and Consuelo Borrás. 2003. "Mitochondrial Theory of Aging: Importance to Explain Why Females Live Longer than Males." *Antioxidants & redox signaling* 5(5): 549–56.
- Voccoli, Vladimir, and Laura Colombaioni. 2009. "Mitochondrial Remodeling in Differentiating Neuroblasts." *Brain research* 1252: 15–29.
- Vogel, Frank, Carsten Bornhövd, Walter Neupert, and Andreas S Reichert. 2006. "Dynamic Subcompartmentalization of the Mitochondrial Inner Membrane." *The Journal of cell biology* 175(2): 237–47.
- Vonck, Janet, and Eva Schäfer. 2009. "Supramolecular Organization of Protein Complexes in the Mitochondrial Inner Membrane." *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 117–24.
- Votruba, M, A T Moore, and S S Bhattacharya. 1998. "Clinical Features, Molecular Genetics, and Pathophysiology of Dominant Optic Atrophy." *J Med Genet* 35(10): 793–800.
- Votyakova, T V, and I J Reynolds. 2001. "DeltaPsi(m)-Dependent and -Independent Production of Reactive Oxygen Species by Rat Brain Mitochondria." *Journal of neurochemistry* 79(2): 266–77.
- De Vries, Helga E, Maarten Witte, David Hondius, Annemieke J M Rozemuller, Benjamin Drukarch, Jeroen Hoozemans, and Jack van Horssen. 2008. "Nrf2-Induced Antioxidant Protection: A Promising Target to Counteract ROS-Mediated Damage in Neurodegenerative Disease?" *Free radical biology & medicine* 45(10): 1375–83.
- Wakabayashi, Junko, Zhongyan Zhang, Nobunao Wakabayashi, Yasushi Tamura, Masahiro Fukaya, Thomas W Kensler, Miho Iijima, and Hiromi Sesaki. 2009. "The Dynamin-Related GTPase Drp1 Is Required for Embryonic and Brain Development in Mice." *The Journal of cell biology* 186(6): 805–16.
- Wang, Chunxin, and Richard J Youle. 2009. "The Role of Mitochondria in Apoptosis\*." *Annual review of genetics* 43: 95–118.
- Wang, Hongxia, Pingping Song, Lei Du, Weili Tian, Wen Yue, Min Liu, Dengwen Li, Bin Wang, Yushan Zhu, Cheng Cao, Jun Zhou, and Quan Chen. 2011. "Parkin Ubiquitinates Drp1 for Proteasome-Dependent Degradation: Implication of Dysregulated Mitochondrial Dynamics in Parkinson Disease." *The Journal of biological chemistry* 286(13): 11649–58.
- Wang, L. 2003. "Varicosities of Intraretinal Ganglion Cell Axons in Human and Nonhuman Primates." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(1): 2–9.
- Wang, Xianhua, Huaqiang Fang, Zhanglong Huang, Wei Shang, Tingting Hou, Aiwu Cheng, and Heping Cheng. 2013. "Imaging ROS Signaling in Cells and Animals." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 91(8): 917–27.
- Wang, Yun E, Georgi K Marinov, Barbara J Wold, and David C Chan. 2013. "Genome-Wide Analysis Reveals Coating of the Mitochondrial Genome by TFAM." *PLoS one* 8(8): e74513.



- Wasiak, Sylwia, Rodolfo Zunino, and Heidi M McBride. 2007. "Bax/Bak Promote Sumoylation of DRP1 and Its Stable Association with Mitochondria during Apoptotic Cell Death." *The Journal of cell biology* 177(3): 439–50.
- Waterham, Hans R, Janet Koster, Carlo W T van Roermund, Petra A W Mooyer, Ronald J A Wanders, and James V Leonard. 2007. "A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission." *The New England journal of medicine* 356(17): 1736–41.
- Watt, Ian N, Martin G Montgomery, Michael J Runswick, Andrew G W Leslie, and John E Walker. 2010. "Bioenergetic Cost of Making an Adenosine Triphosphate Molecule in Animal Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39): 16823–27.
- Wei, T, C Chen, J Hou, W Xin, and A Mori. 2000. "Nitric Oxide Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Neuronal Cells." *Biochimica et biophysica acta* 1498(1): 72–79.
- Wenz, Tina, Francisca Diaz, Bruce M Spiegelman, and Carlos T Moraes. 2008. "Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  Pathway Prevents a Bioenergetic Deficit and Effectively Improves a Mitochondrial Myopathy Phenotype." *Cell metabolism* 8(3): 249–56.
- White, Kathryn E, Vanessa J Davies, Vanessa E Hogan, Malgorzata J Piechota, Philip P Nichols, Douglas M Turnbull, and Marcela Votruba. 2009. "OPA1 Deficiency Associated with Increased Autophagy in Retinal Ganglion Cells in a Murine Model of Dominant Optic Atrophy." *Investigative ophthalmology & visual science* 50(6): 2567–71.
- Wickner, William, and Randy Schekman. 2008. "Membrane Fusion." *Nature structural & molecular biology* 15(7): 658–64.
- Wilkerson, Donald C, and Uma Sankar. 2011. "Mitochondria: A Sulfhydryl Oxidase and Fission GTPase Connect Mitochondrial Dynamics with Pluripotency in Embryonic Stem Cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* 43(9): 1252–56.
- Winge, Dennis R. 2012. "Sealing the Mitochondrial Respirasome." *Molecular and cellular biology* 32(14): 2647–52.
- Wittig, Ilka, and Hermann Schägger. "Structural Organization of Mitochondrial ATP Synthase." *Biochimica et biophysica acta* 1777(7-8): 592–98.
- Wolter, K G, Y T Hsu, C L Smith, A Nechushtan, X G Xi, and R J Youle. 1997. "Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis." *The Journal of cell biology* 139(5): 1281–92.
- Wong, Edith D, Jennifer A Wagner, Sidney V Scott, Voytek Okreglak, Timothy J Holewinski, Ann Cassidy-Stone, and Jodi Nunnari. 2003. "The Intramitochondrial Dynamin-Related GTPase, Mgm1p, Is a Component of a Protein Complex That Mediates Mitochondrial Fusion." *The Journal of cell biology* 160(3): 303–11.
- Wu, Z, P Puigserver, U Andersson, C Zhang, G Adelmant, V Mootha, A Troy, S Cinti, B Lowell, R C Scarpulla, and B M Spiegelman. 1999. "Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1." *Cell* 98(1): 115–24.
- Xie, Hong, Jisong Guan, Laura A Borrelli, Jing Xu, Alberto Serrano-Pozo, and Brian J Bacskai. 2013. "Mitochondrial Alterations near Amyloid Plaques in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33(43): 17042–51.
- Xie, Jiansheng, Hao Wu, Chunyan Dai, Qiangrong Pan, Zonghui Ding, Danqing Hu, Bingyan Ji, Yan Luo, and Xun Hu. 2014. "Beyond Warburg Effect - Dual Metabolic Nature of Cancer Cells." *Scientific reports* 4: 4927.
- Xiong, Nian, Xi Long, Jing Xiong, Min Jia, Chunnuan Chen, Jinsha Huang, Devina Ghoorah, Xiangquan Kong, Zhicheng Lin, and Tao Wang. 2012. "Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone-Induced Toxicity and Its Potential Mechanisms in Parkinson's Disease Models." *Critical reviews in toxicology* 42(7): 613–32.
- Yadava, N, P Potluri, and I E Scheffler. 2008. "Investigations of the Potential Effects of Phosphorylation of the MWFE and ESSS Subunits on Complex I Activity and Assembly." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(3): 447–60.
- Yamaguchi, Ryuji, Lydia Lartigue, Guy Perkins, Ray T Scott, Amruta Dixit, Yulia Kushnareva, Tomomi Kuwana, Mark H Ellisman, and Donald D Newmeyer. 2008. "Opa1-Mediated Cristae Opening Is Bax/Bak and BH3 Dependent, Required for Apoptosis, and Independent of Bak Oligomerization." *Molecular cell* 31(4): 557–69.
- Yan, Michael H, Xinglong Wang, and Xiongwei Zhu. 2013. "Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Alzheimer Disease and Parkinson Disease." *Free radical biology & medicine* 62: 90–101.
- Yang, Jen-Tsung, Zih-Ling Li, Jin-Yi Wu, Fung-Jou Lu, and Ching-Hsein Chen. 2014. "An Oxidative Stress Mechanism of Shikonin in Human Glioma Cells." *PloS one* 9(4): e94180.
- Yankovskaya, Victoria, Rob Horsefield, Susanna Törnroth, César Luna-Chavez, Hideto Miyoshi, Christophe Léger, Bernadette Byrne, Gary Cecchini, and So Iwata. 2003. "Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation." *Science (New York, N.Y.)* 299(5607): 700–704.

- Yao, Jia, and Roberta Diaz Brinton. 2012. 64 *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.) *Estrogen Regulation of Mitochondrial Bioenergetics: Implications for Prevention of Alzheimer's Disease*. Elsevier Inc.
- Yao, Wenliang, Xiaodong Jiao, J Fielding Hejtmancik, M Cristina Leske, Anselm Hennis, and Barbara Nemesure. 2006. "Evaluation of the Association between OPA1 Polymorphisms and Primary Open-Angle Glaucoma in Barbados Families." *Molecular vision* 12: 649–54.
- Yarosh, Will, Jessica Monserrate, James Jiayuan Tong, Stephanie Tse, Phung Khanh Le, Kimberly Nguyen, Carrie B Brachmann, Douglas C Wallace, and Taosheng Huang. 2008. "The Molecular Mechanisms of OPA1-Mediated Optic Atrophy in Drosophila Model and Prospects for Antioxidant Treatment." *PLoS genetics* 4(1): e6.
- Yen, May-Yung, An-Guor Wang, and Yau-Huei Wei. 2006. "Leber's Hereditary Optic Neuropathy: A Multifactorial Disease." *Progress in retinal and eye research* 25(4): 381–96.
- Yu-Wai-Man, P, P G Griffiths, G S Gorman, C M Lourenco, A F Wright, M Auer-Grumbach, A Toscano, O Musumeci, M L Valentino, L Caporali, C Lamperti, C M Tallaksen, P Duffey, J Miller, R G Whittaker, M R Baker, M J Jackson, M P Clarke, B Dhillon, B Czermin, J D Stewart, G Hudson, P Reynier, D Bonneau, W Marques Jr., G Lenaers, R McFarland, R W Taylor, D M Turnbull, M Votruba, M Zeviani, V Carelli, L A Bindoff, R Horvath, P Amati-Bonneau, and P F Chinnery. "Multi-System Neurological Disease Is Common in Patients with OPA1 Mutations." *Brain* 133(Pt 3): 771–86.
- Yu-Wai-Man, P, J D Stewart, G Hudson, R M Andrews, P G Griffiths, M K Birch, and P F Chinnery. 2010. "OPA1 Increases the Risk of Normal but Not High Tension Glaucoma." *Journal of medical genetics* 47(2): 120–25.
- Yu-Wai-Man, Patrick, Philip G Griffiths, and Patrick F Chinnery. 2011. "Mitochondrial Optic Neuropathies - Disease Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Progress in retinal and eye research* 30(2): 81–114.
- Yuyun, Xiong, Qian Jinjun, Xu Minfang, Qiu Jing, Xia Juan, Ma Rui, Zhu Li, and Gao Jing. 2013. "Effects of Low Concentrations of Rotenone upon Mitohormesis in SH-SY5Y Cells." *Dose-response : a publication of International Hormesis Society* 11(2): 270–80.
- Zanna, Claudia, Anna Ghelli, Anna Maria Porcelli, Mariusz Karbowski, Richard J Youle, Simone Schimpf, Bernd Wissinger, Marcello Pinti, Andrea Cossarizza, Sara Vidoni, Maria Lucia Valentino, Michela Rugolo, and Valerio Carelli. 2008. "OPA1 Mutations Associated with Dominant Optic Atrophy Impair Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Fusion." *Brain : a journal of neurology* 131(Pt 2): 352–67.
- Zatloukal, Bernhard, Iris Kufferath, Andrea Thueringer, Ulf Landegren, Kurt Zatloukal, and Johannes Haybaeck. 2014. "Sensitivity and Specificity of In Situ Proximity Ligation for Protein Interaction Analysis in a Model of Steatohepatitis with Mallory-Denk Bodies." *PLoS one* 9(5): e96690.
- Zerbes, Ralf M, Ida J van der Klei, Marten Veenhuis, Nikolaus Pfanner, Martin van der Laan, and Maria Bohnert. 2012. "Mitofilin Complexes: Conserved Organizers of Mitochondrial Membrane Architecture." *Biological chemistry* 393(11): 1247–61.
- Zeviani, Massimo. 2008. "OPA1 Mutations and Mitochondrial DNA Damage: Keeping the Magic Circle in Shape." *Brain : a journal of neurology* 131(Pt 2): 314–17.
- Zhang, Donna D, and Mark Hannink. 2003. "Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress." *Molecular and cellular biology* 23(22): 8137–51.
- Zhang, Donna D, Shih-Ching Lo, Janet V Cross, Dennis J Templeton, and Mark Hannink. 2004. "Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex." *Molecular and cellular biology* 24(24): 10941–53.
- Zhang, Zhongyan, Nobunao Wakabayashi, Junko Wakabayashi, Yasushi Tamura, Woo-Jin Song, Sam Sereda, Pascaline Clerc, Brian M Polster, Susan M Aja, Mikhail V Pletnikov, Thomas W Kensler, Orian S Shirihai, Miho Iijima, Mehboob a Hussain, and Hiromi Sesaki. 2011. "The Dynamin-Related GTPase Opa1 Is Required for Glucose-Stimulated ATP Production in Pancreatic Beta Cells." *Molecular biology of the cell* 22(13): 2235–45.
- Zhao, Fei, Tongde Wu, Alexandria Lau, Tao Jiang, Zheping Huang, Xiao-Jun Wang, Weimin Chen, Pak Kin Wong, and Donna D Zhang. 2009. "Nrf2 Promotes Neuronal Cell Differentiation." *Free radical biology & medicine* 47(6): 867–79.
- Zhao, Jian, Tong Liu, Shao-Bo Jin, Nikolay Tomilin, Juan Castro, Oleg Shupliakov, Urban Lendahl, and Monica Nistér. 2009. "The Novel Conserved Mitochondrial Inner-Membrane Protein MTGM Regulates Mitochondrial Morphology and Cell Proliferation." *Journal of cell science* 122(Pt 13): 2252–62.
- Zhao, Xiangxuan, Changhai Tian, William M Puszyk, Olorunseun O Ogunwobi, Mengde Cao, Ton Wang, Roniel Cabrera, David R Nelson, and Chen Liu. 2013. "OPA1 Downregulation Is Involved in Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 93(1): 8–19.

- Zhao, Yan, and Baolu Zhao. 2013. "Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 316523.
- Zick, Michael, Stéphane Duvezin-Caubet, Anja Schäfer, Frank Vogel, Walter Neupert, and Andreas S Reichert. 2009. "Distinct Roles of the Two Isoforms of the Dynamin-like GTPase Mgm1 in Mitochondrial Fusion." *FEBS letters* 583(13): 2237–43.
- Zuchner, S, I V Mersiyanova, M Muglia, N Bissar-Tadmouri, J Rochelle, E L Dadali, M Zappia, E Nelis, A Patitucci, J Senderek, Y Parman, O Evgrafov, P D Jonghe, Y Takahashi, S Tsuji, M A Pericak-Vance, A Quattrone, E Battaloglu, A V Polyakov, V Timmerman, J M Schroder, and J M Vance. 2004. "Mutations in the Mitochondrial GTPase Mitofusin 2 Cause Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A." *Nat Genet* 36(5): 449–51.
- Zucker, Shoshanna N, Emily E Fink, Archis Bagati, Sudha Mannava, Anna Bianchi-Smiraglia, Paul N Bogner, Joseph A Wawrzyniak, Colleen Foley, Katerina I Leonova, Melissa J Grimm, Kalyana Moparthy, Yuriy Ionov, Jianmin Wang, Song Liu, Sandra Sexton, Eugene S Kandel, Andrei V Bakin, Yuesheng Zhang, Naftali Kaminski, Brahm H Segal, and Mikhail A Nikiforov. 2014. "Nrf2 Amplifies Oxidative Stress via Induction of Klf9." *Molecular cell* 53(6): 916–28.
- Zunino, Rodolfo, Astrid Schauss, Peter Rippstein, Miguel Andrade-Navarro, and Heidi M McBride. 2007. "The SUMO Protease SENP5 Is Required to Maintain Mitochondrial Morphology and Function." *Journal of cell science* 120(Pt 7): 1178–88.

## **Involvement of the mitochondrial protein OPA1 in redox state regulation and characterization of OPA1-partners: which consequences in Dominant Optic Atrophy pathogenesis?**

Dominant Optic Atrophy (DOA) is a common cause of inherited visual failure affecting at least 1 in 50 000 persons in Europe. OPA1 mutations are the main genetic cause of DOA, causing bilateral symmetrical optic atrophy due to specific loss of retinal ganglion cells. Although optic nerve degeneration remains the hallmark of DOA, a syndromic form called “DOA plus”, including deafness, ataxia and/or myopathy, was recently reported to affect up to 20% of all mutations carriers. More than 200 mutations have been listed, most are truncations in line with haploinsufficiency being the major pathogenic mechanism of DOA. OPA1 is a dynamin anchored to the inner mitochondrial membrane and involved in mitochondrial dynamics, and also has an anti-apoptotic function. Some reports using cellular or invertebrate models of DOA suggest a role of OPA1 in oxidative metabolism, but they still remain controversial and the precise mechanistic involved in DOA pathogenesis is still unknown. To characterize the molecular and cellular consequences of OPA1 loss of function (depletion or mutations), we have studied intracellular redox homeostasis through oxidative metabolism and antioxidant defenses. In addition, we have looked for OPA1-partners to unravel the dynamin functions.

To mimic haploinsufficiency in human cells (HeLa) and in rodent cortical neurons in primary culture, OPA1 was down-regulated by an RNA interference strategy. In both models, the amount and activity of the mitochondrial respiratory chain proteins is decreased, as well as the activity of aconitase, which is sensitive to intra-mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS), indicating that the cellular oxidative metabolism is disturbed. To evaluate the cellular antioxidant responses, we focused on the major detoxification pathway centered on the NRF2 transcription factor, which we found active in both OPA1 down-regulated cellular models. Furthermore, some NRF2 target proteins quantity and/or activity are increased, such as superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, 2), catalase and GSTP1. Thus, down-regulation of OPA1 induced a deregulation of redox homeostasis: cells are in a pro-oxidative state. Moreover, upon application of an acute exogenous oxidative stress, OPA1-depleted neurons do not show any increase of their antioxidant defenses and die earlier than control cells. We hypothesize that these OPA1-depleted cells become sensitive to oxidative stress, which could induce cell death since the antioxidant machinery can not be further activated. To extend our analysis to a more physiological model, we measured the redox state status of cortices of OPA1+/- mice. We found a high ROS level in cortices of 4 and 10 month-old animals, evaluated indirectly by aconitase activity drastic decrease. Thus, like the cellular models, OPA1+/- mice appear to be in a disturbed redox state.

Since the redox homeostasis deregulations observed in cellular and animal models could explain DOA pathogenesis, we determined if these disturbances were found in patients' cells. We evaluated antioxidant enzymes quantities in skin fibroblasts of DOA patients and found cases of very low defenses, for instance of superoxide dismutase, a key ROS detoxifying enzyme. Thus, these patients may be more sensitive to exogenous stress such as UV or hypoxia, which can be aggravating factors of the disease and could lead to accelerated RGC loss.

Finally, to shed more light on OPA1 functions, we conducted an interactome analysis to identify its protein partners, in rodent primary cortical neurons. Among the 3 proteins identified in 3 independent replicates, we found an oxidative metabolism enzyme, in line with our previous results on the involvement of OPA1 in redox state regulation.

Therefore, our results open novel ways for the understanding of DOA pathogenesis and could provide therapeutic perspectives, such as the use of antioxidant molecules to prevent or slowdown optic atrophy and extra-ocular symptoms.

*Key words: mitochondria, oxidative metabolism, antioxidant defenses, OPA1, redox state, Dominant Optic Atrophy (DOA).*

## **Implication de la protéine mitochondriale OPA1 dans l'homéostasie redox et caractérisation de ses partenaires protéiques : quelles conséquences sur la pathogenèse de l'Atrophie Optique Dominante de type 1 ?**

L'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1) est une rétinopathie héréditaire qui se traduit par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine suivie d'une atrophie du nerf optique. L'ADOA-1 est caractérisée par une diminution de l'acuité visuelle, pouvant entraîner la cécité et reste à l'heure actuelle sans recours thérapeutique. Une forme syndromique nommée « ADOA-1 plus » touche environ 20% des patients et se traduit par des atteintes extra-oculaires de type ataxie ou surdité. Des mutations du gène codant la protéine mitochondriale OPA1 ont été décrites comme responsables de l'ADOA-1 et aboutissent dans la majorité des cas à un phénomène d'haploinsuffisance. De nombreuses études ont montré que la dynamine OPA1 est impliquée dans la fusion des membranes internes mitochondriales et possède un rôle anti-apoptotique. Des travaux menés sur des modèles cellulaires ou invertébrés de l'ADOA-1 suggèrent une implication de la dynamine dans le métabolisme oxydatif mitochondrial mais ces données restent toutefois controversées et les mécanismes moléculaires sous-jacents inconnus. C'est pourquoi nous avons analysé l'homéostasie redox de la cellule en étudiant l'état du métabolisme oxydatif et la mise en place des défenses antioxydantes. Parallèlement, nous avons identifié l'environnement protéique d'OPA1, par une approche de protéomique, afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués notamment dans les fonctions identifiées de la dynamine.

Des cellules humaines (HeLa) et des neurones corticaux (rat) en culture primaire ont été traités par une stratégie d'interférence ARN pour diminuer l'expression d'OPA1 et ainsi mimer un phénomène d'haploinsuffisance. Dans ces deux modèles, la quantité et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale sont diminuées ainsi que l'activité de l'aconitase, (une enzyme sensible aux taux d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) intra-mitochondriaux) suggérant que le métabolisme oxydatif des cellules est perturbé. La réponse antioxydante a été mesurée par l'analyse d'une des voies principales de détoxification faisant intervenir le facteur de transcription NRF2, qui est activé dans les deux modèles invalidés pour OPA1. De plus, certaines enzymes cibles de NRF2, comme les superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD1/2), la catalase et GSTP1, voient leur quantité et/ou leur activité augmentées. Ainsi, la perte d'OPA1 induit une dérégulation de l'homéostasie redox : les cellules sont dans un état pro-oxydant. Lors de l'application d'un stress oxydatif exogène aigu, les neurones traités par un siOPA1 ne voient pas leurs défenses antioxydantes augmentées et meurent plus que les cellules contrôles, suggérant une saturation des activités antioxydantes. Ensuite, nous avons montré une diminution drastique de l'activité de l'aconitase de cortex de souris modèles de l'ADOA-1, à 4 et 10 mois, caractéristique d'une production élevée d'EAOs mitochondriaux. Ainsi, comme les modèles cellulaires, les souris mutées pour OPA1 sont dans un état pro-oxydant. Nous avons de plus analysé l'expression des enzymes antioxydantes dans des fibroblastes de peau de patients atteints d'ADOA-1. Certains individus présentent des niveaux protéiques d'enzymes de détoxification très faibles, notamment les SOD1 et 2. Ces patients seraient donc plus sensibles aux stress exogènes tels que les UVs ou l'hypoxie, ce qui constituerait un facteur aggravant de la pathologie.

Enfin, les résultats de l'int ractome de la dynamine ont permis l'identification de 3 protéines partenaires (dans 3 réplicats biologiques), dont une enzyme du métabolisme oxydatif, appuyant l'implication d'OPA1 dans la régulation de l'état redox.

Ces résultats ouvrent donc de nouvelles pistes pour la compréhension de la pathogenèse de l'ADOA-1 et permettraient de proposer des perspectives thérapeutiques à court terme, comme l'utilisation de molécules antioxydantes, pour prévenir ou retarder l'atrophie optique et/ou les syndromes extra-oculaires des patients.

*Mots clés : mitochondrie, métabolisme oxydatif, défenses antioxydantes, OPA1,  tat redox, Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1).*